SYNTHESE UND ANTIGENE EIGENSCHAFTEN 7 -VERKNÜPFTER PROTEINKONJUGATE VON Δ^5-STEROLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MANFRED ZWIRNER
aus Stuttgart

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0006

SYNTHESE UND ANTIGENE EIGENSCHAFTEN 7 -VERKNÜPFTER PROTEINKONJUGATE VON Δ^5-STEROLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MANFRED ZWIRNER
aus Stuttgart

1984

Tag der mündlichen Prüfung	19. Juli 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

A B S T R A C T

Zwirner, Manfred

SYNTHESE UND ANTIGENE EIGENSCHAFTEN 7-VERKNÜPFTER PROTEINKONJUGATE VON Δ^5-STEROLEN

Durch kovalentes Verknüpfen von Steroiden mit Makromolekülen erhält man künstliche Antigene, welche zur Immunisierung tierischer Organismen eingesetzt werden. Die erhaltenen Antiseren werden für den Radioimmunoassay verwendet.

Die Darstellung zweier Steroidhaptene wird beschrieben. Durch Einführung eines Bromsubstituenten wird Position sieben des Androstendiols funktionalisiert, mit metallierter Mercaptopropionsäure zur Thioäthercarbonsäure derivatisiert und an Rinderserumalbumin gekoppelt. Mit der gemischten Anhydrid-Methode lassen sich 19 Steroidreste pro Mol Protein einführen.

Dehydroepiandrosteron wird in Position 7 oxidiert, die Ketonfunktion mit Carboxymethoxylaminhemihydrochlorid zu Carboxymethyloxim kondensiert und nach der Carbodiimid-Methode an Rinderserumalbumin gekoppelt. Mit dieser Variante lassen sich lediglich 6 Mol Steroid pro Mol Protein koppeln.
Durch Immunisierung mit diesen Steroidhaptenen werden Kaninchen zur Antikörperproduktion angeregt. Die erhaltenen Antiseren werden nach Titer, Affinität und Spezifität charakterisiert. Zwei Antiseren der Androstendiol-Serie eignen sich wegen hoher Affinitätskonstanten (K_A = 3.8 x 10^9 L/Mol bzw. 3.4 x 10^9 L/Mol) für den Radioimmunoassay von Androstendiol. Beide Antiseren zeigen hohe Kreuzreaktionen (74%, 83%) zu 5α-Androstandiol, zeichnen sich ansonsten durch hohe Spezifität aus. Ein Dextran-Kohle-Assay zur radioimmunologischen Bestimmung von Androstendiol wird beschrieben. Die Nachweisgrenze liegt bei 20 pg, der Meßbereich endet bei 1000 pg Androstendiol.

Die Richtigkeit der Methode wird durch Wiederfindungstests gesichert, der Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen innerhalb des Meßbereichs liegt zwischen 7% und 13%.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von Januar 1976 bis Juli 1983 unter der Leitung von Professor Dr. W. Voelter im chemischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Voelter danke ich herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. Bayer danke ich für die Bereitstellung von Institutseinrichtungen.

Herrn Professor Dr. H. A. Hirsch danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung der Laborausrüstung in der Frauenklinik.

Herrn Professor Dr. A.E. Schindler danke ich für die vielen informativen Gespräche über den Problemkreis klinische Endokrinologie.

Für die sorgfältige Aufnahme zahlreicher Spektren und die Durchführung von Analysen bin ich den folgenden Damen und Herren zu Dank verpflichtet:

Herrn Dr. K. Albert, Herrn R. Bretthauer, Frau H. Clement, Herrn Dr. W. Fuchs und Herrn B. Meier (^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR), Herrn H. Bartholomä, Herrn Dr. R. Müller und Herrn Prof. Dr. K.P. Zeller (FD-MS, MS), Frau U. Förstel (IR) und Herrn H.J. Wurmstich (Elementaranalysen).

Herrn Dipl.-Chem. Harald Seeger danke ich für die Anfertigung der Strukturformeln, Herrn Ch. Roth für die Fotoarbeiten, Frau Ruth Beeh für die Erstschrift und Frau Juliane Koldorf für die Reinschrift der Arbeit.

Herrn Dr. Dipl.-Chem. D. Handschuh danke ich recht herzlich für die sachkundige, kollegiale Hilfe bei der Diskussion der NMR-Spektren.

ABKÜRZUNGEN

Acan	Essigsäureanhydrid
BuLi	n-Butyllithium
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EtOH	Ethanol
MS	Massenspektrum
MG	Molekulargewicht
IR	Infrarot
NBs	N-Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
RIA	Radioimmunoassay
RSA	Rinderserumalbumin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
UV	Elektronenanregungsspektroskopie im ultravioletten Bereich

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	3
3.	Allgemeiner Teil	6
3.1.	Synthese der Steroidhaptene	7
3.1.1.	Synthese und Strukturbestimmung der Ausgangsprodukte	9
3.1.2.	Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat (II)	9
3.1.3.	Syntheseweg zum Androstendiol-Proteinkonjugat	12
3.1.3.1.	Synthese von 3ß-Acetoxy-5-Androsten-17-on (IV)	14
3.1.3.2.	Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat (V)	16
3.1.3.3.	Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VI)	18
3.1.3.4.	Synthese von 7α-Brom-5-androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VII)	2o
3.1.3.5.	Synthese von 7α-Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol (VIII)	23
3.2.	Syntheseweg zum Dehydroepiandrosteron-Proteinkonjugat	27
3.2.1.	Synthese von 17,17'-Ethylendioxy-5-androsten-3ß-yl-acetat (X)	29
3.2.2.	Synthese von 3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on (XI)	31
3.2.3.	Synthese von 3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (XII)	33
4.	Zusammenstellung und Diskussion der spektroskopischen Daten	42
4.1.	Infrarot-spektroskopische Daten	42
4.2.	Massenspektrometrische Daten	49
4.3.	^{1}H-NMR-spektroskopische Daten	54
4.4.	^{13}C-NMR-spektroskopische Daten	6o
4.5.	UV-spektroskopische Daten	69
4.6.	Drehwerte	72

5.	Konjugation der Steroidhaptene an Rinderserum-albumin	73
5.1.	Synthese von 7α-Carboxyethylmercapto-5-androst-en-3ß,17ß-diol-Rinderserumalbumin	74
5.2.	Synthese von 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on-7-(O-carboxymethyl)-oxim-Rinderserumalbumin	75
5.3.	Analyse der Konjugate	76
5.4.	Bestimmung der Zahl der kovalent gebundenen Steroid-haptenreste im Androstendiol-Proteinkonjugat mit der Katalase -Methode	77
5.4.1.	Berechnung des Steroidhaptengehalts pro Mol Rinder-serumalbumin	78
5.5.	Bestimmung der Molzahl an Steroidhapten im Dehydro-epiandrosteron-Proteinkonjugat	8o
5.5.1.	Berechnung des Steroidhaptengehaltes pro Mol Rinder-serumalbumin über UV-Messungen	81
6.	Immunologische Untersuchungen	83
6.1.	Antigen-Antikörper	83
6.2.	Immunisierung	84
6.3.	Charakterisierung der erhaltenen Steroidantiseren	85
6.3.1.	Bestimmung des Antikörpertiters	85
6.3.2.	Reaktionskinetik der Antigen-Antikörper-Komplex-bildung	88
6.3.3.	Bestimmung der Assoziationskonstanten der Antiseren	9o
6.4.	Spezifität der Antiseren	95
7.	Der Radioimmunoassay von Androstendiol	1oo
7.1.	Standards	1oo
7.2.	Tracer	1o1
7.3.	Inkubation	1o2
7.4.	Trennung von gebundenem und nicht antikörper-gebundenem Antigen	1o2
7.5.	Durchführung des Radioimmunoassay	1o3
7.6.	Auswertung	1o5
7.7.	Qualitätskontrolle	1o8

7.7.1.	Präzision des Androstendiolassays	1o8
7.7.2.	Richtigkeit des Androstendiolassays	111
7.7.3.	Spezifität des Androstendiolassays	111
8.	Experimenteller Teil	113
8.1.	Chemikalien	113
8.2.	Chromatographische Methoden	115
8.3.	Spektroskopische Methoden	116
8.4.	Sonstige Menthoden	118
8.5.	Arbeitsvorschriften	12o
9.	Zusammenfassung	134
1o.	Literaturverzeichnis	14o

1. Einleitung

Die Entwicklung des Radioimmunoassay durch YALOW und BERSON [1-3], mit dessen Hilfe zuerst Insulin in geringsten Mengen nachgewiesen werden konnte, leitete eine stürmische Entwicklung auf diesem Gebiet ein.

In der Folgezeit wurden eine Reihe von Radioimmunoassays zur Messung von Peptidhormonen und anderen antigenen Substanzen entwickelt [4-6].

Die Anwendung der Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen erfolgte zwangsläufig aus 2 Hauptgründen:

1. wegen der sehr niedrigen Konzentration dieser Stoffe in den Körperflüssigkeiten,
2. wegen der strukturellen Ähnlichkeit der Steroidhormone untereinander.

An beiden Punkten scheiterte bisher der Einsatz herkömmlicher Analysenmethoden.

Eine Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz des Radioimmunoassay ist das verwendete Antiserum. Die Spezifität des Antiserums hängt nicht zuletzt vom "Design" des antigenen Komplexes ab, welcher zur Immunisierung benutzt wird.

Der limitierende Faktor für eine aktive Immunisierung ist u.a. die Größe (Molekulargewicht) des Antigens.
So werden größere Molekülverbände, wie z. B. Insulin oder eine Reihe anderer Proteohormone bereits wegen ihres hohen Molekulargewichts vom Fremdorganismus als Immunogen erkannt.
Solche Verhältnisse sind bei den Steroiden nicht gegeben. Jedoch können die Steroide als sogenannte "Haptene" oder Halbantigene wirken, wenn sie in ausreichender Zahl kovalent an einen makromolekularen Träger gekoppelt werden [7-10].

Die erste Generation der so gewonnenen Antikörper gegen Steroide hatte den Nachteil der geringen Spezifität. So konnten zwar Östrogene von nicht phenolischen Steroidhormonen unterschieden werden, unterschiedliche Östrogene wurden jedoch nicht differenziert. Deshalb waren chromatographische Trennungsschritte notwendig, um solche kreuzreagierende Hormone zu separieren.

Ein Grund für die geringe Spezifität der Antiseren war sicher die Lage der Kopplung zwischen Steroid und makromolekularem Träger im verwendeten Hapten.
Von LIEBERMANN[10], einem der Pioniere auf diesem Gebiet, wurden damals funktionelle Gruppen des Steroidmoleküls als Anker zur Verknüpfung mit dem Proteinträger herangezogen. Dies hatte den Nachteil, daß hormonspezifische strukturelle Gegebenheiten am Molekül maskiert wurden[12].

Die Unspezifität der Antikörper im Bereich der Kopplungsstelle war für die Gruppen um LINDNER[13] und MIDGLEY und NISWENDER[14] Antriebsfeder eine neue Generation von Steroidhaptenen zu schaffen. Aus den bisherigen Erkenntnissen postulierten sie, daß im Hapten die funktionellen Gruppen und deren sterische Anordnung erhalten bleiben müssen. Denn nur so wird die Variabilität des Steroidmoleküls voll auf den Antikörper übertragen. Mit der Einführung zusätzlicher reaktiver Zentren in den Steroidkern, welche dann als Anker für die Verknüpfung zum hochmolekularen Träger fungierten, gelang es schließlich hochspezifische Antiseren zu erzeugen. Als Ankerpunkte wurden Ketonfunktionen oder Hydroxylgruppen in das Steroidhormon eingebaut[15,16]. Auch Halogengruppen und Epoxide sind geeignet[17-19].

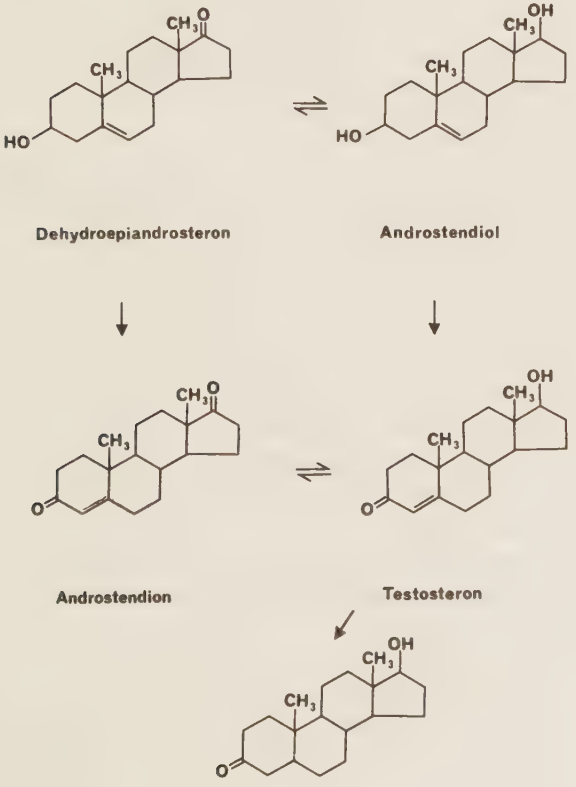
Durch den Einsatz dieser hochspezifischen Antikörper in der radioimmunologischen Hormonanalytik hat die Diagnostik endokriner Störungen eine entscheidende Bereicherung erfahren.

Es können jetzt therapeutische Konsequenzen gezogen werden, an die vorher nicht einmal zu denken war.

2. Problemstellung

Unter den Steroiden mit androgener Wirkung ist das Testosteron der bekannteste Vertreter. Seine Bildung im menschlichen Organismus verläuft über eine Reihe von Metaboliten, welche ebenfalls androgene Aktivität aufweisen[20-23].

Bei nichtschwangeren Frauen werden die Androgene und ihre Vorläufer in der Nebennierenrinde und den Ovarien gebildet. In der folgenden Abbildung sind wichtige sekretorische Metaboliten und Kontrollmechanismen der Zona reticularis abgebildet.



Während viele physiologische und pathophysiologische Veränderungen des androgenen Formenkreises über die radioimmunologische Bestimmung von Androstendion, Dehydroepiandrosteron und Testosteron erklärt werden konnten, ist die Literatur über die physiologische Rolle des Androstendiols spärlich. Es scheint, daß dieses Hormon jedoch eine beträchtliche Rolle bei manchen hyperandrogenen Zuständen von Frauen spielt[24-26].

Überdies scheinen physiologische Konzentrationen von Androstendiol mit dem Östradiol um die Bindung an Östrogenrezeptoren bei Mammakarzinom zu konkurrieren[27].

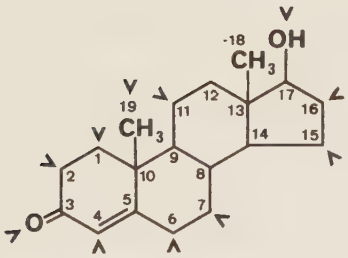
Aus klinischer Sicht stellte sich jetzt die Forderung durch die radioimmunologische Bestimmung von Androstendiol mehr über dessen physiologische Aktivität zu erfahren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun, die Voraussetzungen zu schaffen, sowohl Androstendiol als auch Dehydroepiandrosteron im Plasma radioimmunologisch messen zu können.

Dazu ist es notwendig, 4 Problempunkte zu lösen.

1. Die Synthese der Steroidhaptene und deren Kopplung mit dem makromolekularen Träger.
2. Die aktive Immunisierung des tierischen Organismus mit diesen Konjugaten um Antikörper zu erzeugen.
3. Die Charakterisierung der Antikörper auf Spezifität und Sensitivität.
4. Die Entwicklung einer radioimmunologischen Methode zur Messung der Hormone im menschlichen Plasma.

In der folgenden Abbildung sind am Beispiel des Testosterons die Punkte angezeigt, welche als Verknüpfungsstellen zur Kupplung mit Spacermolekülen beschrieben worden sind.



3. Allgemeiner Teil

Die Verankerung des Steroidhormons mit dem Protein erreicht man durch Kopplung über ein Brückenglied (Spacermolekül). Dieser Spacer ist entweder ein zweizähniges oder symmetrisches bifunktionelles Reagenz.
Als Anker am Steroidhormon dienen Hydroxyl-, Keton- oder Halogenfunktionen, welche auf chemischem oder enzymatischem Wege zusätzlich ins Steroidskelett eingeführt werden.

Besitzt das bifunktionelle Spacermolekül nach Verknüpfung mit dem Steroidhormon eine terminale Aminogruppe, läßt sich diese mit freien Carbonsäureresten des Proteins kondensieren. Diese Variante ist von Interesse, wenn der Proteinträger reich an Glutamin- oder Asparaginsäureresten ist.

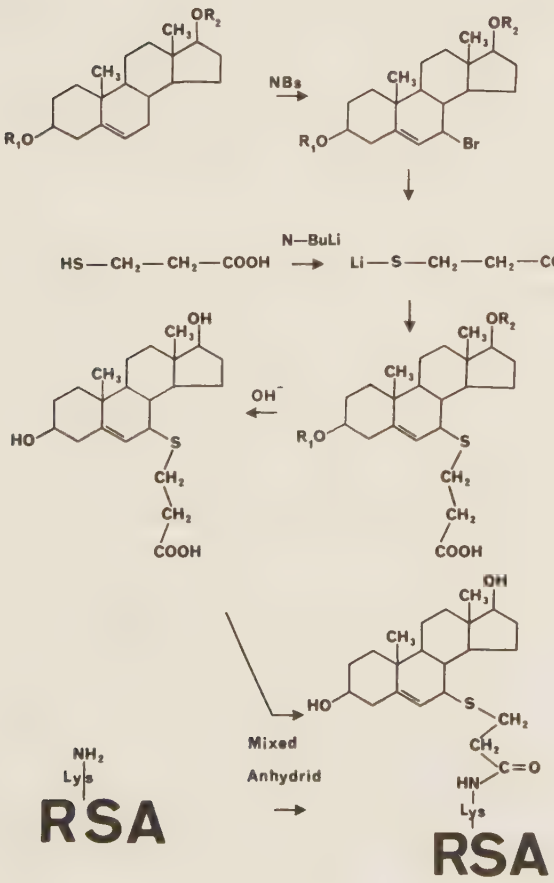
Die weitaus häufiger angewandte Methode verläuft über Carbonsäurederivate von Steroiden. Beispielsweise über Bildung von Hemisuccinaten, Carbonsäurechloriden, -O-carbomethyloxime oder Thioäthercarbonsäuren.

Die Carboxylgruppe solcher Komponenten läßt sich mit freien Aminogruppen, vornehmlich ε -Aminogruppen von Lysinresten des Proteins kondensieren.

Je nach Wahl des Spacers kann die Distanz des Steroidhormons zum Proteinkörper variiert werden. So erhoffte man sich von einer Distanzvergrößerung durch Einführung zusätzlicher inerter Spaceratome ein leichteres "Erkennen" der Steroiddeterminante durch das Immunsystem.
Jedoch scheint eine Kettenlänge von 2 - 3 Kohlenstoffatomen auszureichen, um das Steroid als haptene Determinante am Protein zu fixieren[28].

3.1. Synthese der Steroidhaptene

Die Synthesestrategie zur Darstellung des Androstendiol-haptens ist im folgenden Reaktionsschema abgebildet.



Beim Androstendiol bietet sich die Allylstellung zur Doppelbindung als reaktives Zentrum an. Die Aufbereitung dieser Position ist durch Bromsubstitution nach ZIEGLER[29] mit N-Bromsuccinimid als Reagenz möglich. Allerdings ist es notwendig, die freien Hydroxylfunktionen zu schützen[30]. Dies erreicht man am einfachsten durch Veresterung zum entsprechenden Diacetat.

Leider erhält man nach Umsetzung des Acetats mit N-Bromsuccinimid kein stabiles Bromderivat. Die Stabilität wird offensichtlich durch die Art der Schutzgruppen beeinflußt[32]. Ein stabiles Bromderivat erhält man schließlich, wenn die Hydroxylfunktion am C3 acetyliert und die 17-Hydroxylfunktion benzoyliert ist.

Das Halogenatom wird anschließend durch das zweizähnige Spacermolekül ersetzt. Als Reagenz verwendet man 3-Mercaptopropionsäure. Unter den in der Literatur beschriebenen basisch protischen Reaktionsbedingungen gelingt jedoch eine Umsetzung nicht[31].
Aus früheren Untersuchungen mit N-Butyllithium war dessen Reaktionsfähigkeit und Verwendung als Base bekannt[33].
Man erreicht mit diesem Reagenz unter bestimmten Reaktionsbedingungen einen Metallaustausch acider Protonen. Auch die Mercaptopropionsäure läßt sich mit diesem Reagenz in THF bei 0° C metallieren. Anschließende Umsetzung mit dem bromsubstituierten Steroidderivat ergibt in einer nucleophilen Substitution den erwünschten Thioäther. Schließlich werden unter alkalischer Katalyse die Schutzgruppen am Steroid abgespalten.

Die Verknüpfung des Steroidderivats mit dem Proteinträger erfolgt via Peptidbindung.
Man bedient sich dazu einer von ERLANGER[34,35] beschriebenen Methode, welche über die Bindung eines gemischten Anhydrids verläuft.

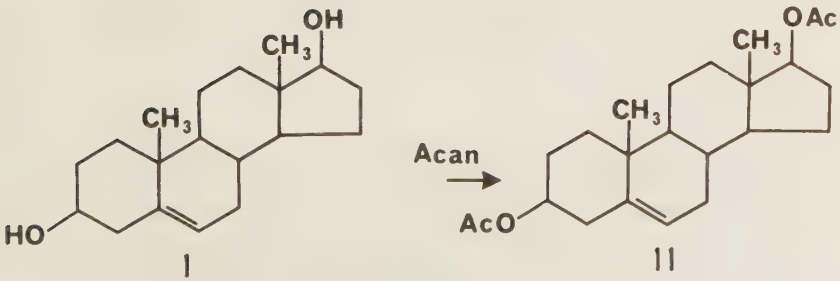
3.1.1.
Synthese und Strukturbestimmung der Ausgangsverbindungen

In den folgenden Abschnitten werden die Synthesen der Zwischenstufen beschrieben.
Spektroskopische Daten der dargestellten Verbindungen werden zu deren Charakterisierung herangezogen und kurz diskutiert. Eine ausführliche Spektrendiskussion erfolgt in einem späteren Kapitel im Zusammenhang.

Sämtliche Reaktionen werden unter Luftsauerstoffausschluß in einer Dreiring-Argonatmosphäre durchgeführt.

3.1.2.
Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat (II)

Die Darstellung läuft nach folgender Reaktionsgleichung ab:



I II

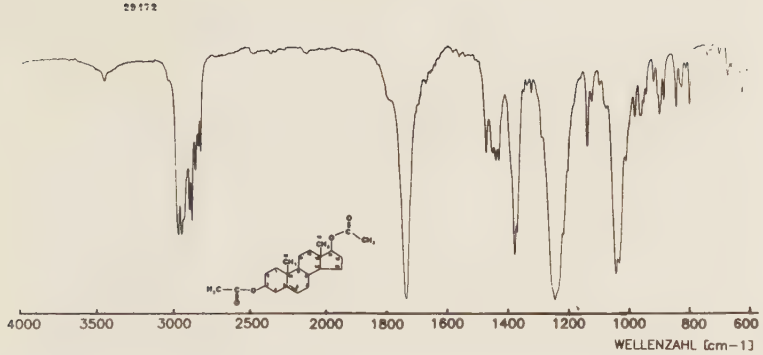
Zum Schutz der beiden sekundären Hydroxylfunktionen des Androstendiols verestert man mit Essigsäureanhydrid. Als Lösungsmittel wird frisch destilliertes, absolut trockenes Pyridin eingesetzt, welches die Reaktion in alkalischer Katalyse unterstützt.
Nach 18stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Pyridin mit Argon abgeblasen und der ölige Rückstand säulenchromatographisch über SiO_2 aufgearbeitet.
Man kristallisiert die gereinigte Fraktion aus einer Äther/Methanol-Mischung. So erhält man farblose Kristalle, die bei 161°C schmelzen.

Das Ergebnis der Elementaranalyse bestätigt die erwartete Zusammensetzung von $C_{23}H_{34}O_4$.

Im Massenspektrum erscheint als schwerstes Massenfragment nicht der Molekülpeak, sondern das (M-60)-Fragment bei m/e 314.

Im IR-Spektrum stellt man erwartungsgemäß fest, daß beim Reaktionsprodukt im Bereich der Hydroxyl-Valenzschwingungen zwischen 3100 und 3700 cm^{-1} keine Absorptionsbande mehr registriert wird. Daraus kann man die vollständige Umsetzung beider Hydroxylfunktionen folgern. Statt dessen erscheint bei 1735 cm^{-1} die starke, charakteristische Carbonylbande der Acetatreste. Die Valenzschwingung der Doppelbindung in Position 5 am Steroidskelett wird von der breiten Carbonylbande fast überdeckt, ist jedoch bei 1660 cm^{-1} noch als kleiner Peak auszumachen.

Im ^{1}H-NMR deuten Lage und Integration der Singuletts bei 2.00 ppm und 2.01 ppm auf die Methylprotonen der Acetylreste hin. Als Folge der Substituenten sind auch die Signale der geminalen Protonen an C3 und C17 von 3,6 nach 4,6 ppm tieffeldverschoben. Das Dublett des vinylischen Protons erscheint unverändert bei 5.34 ppm.



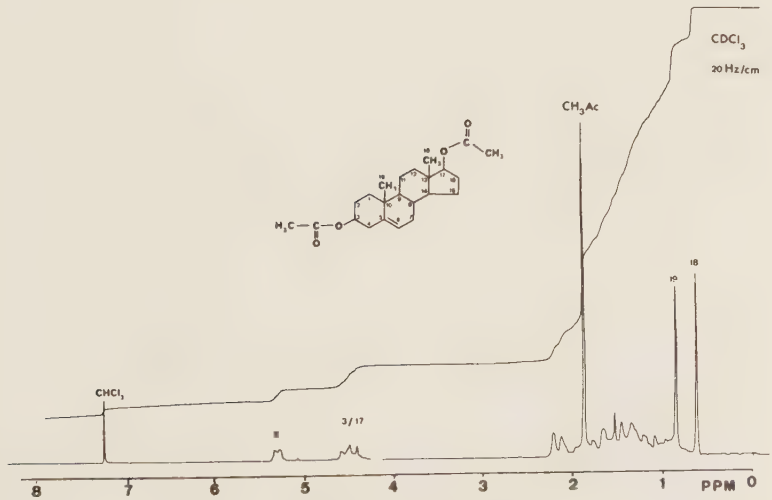
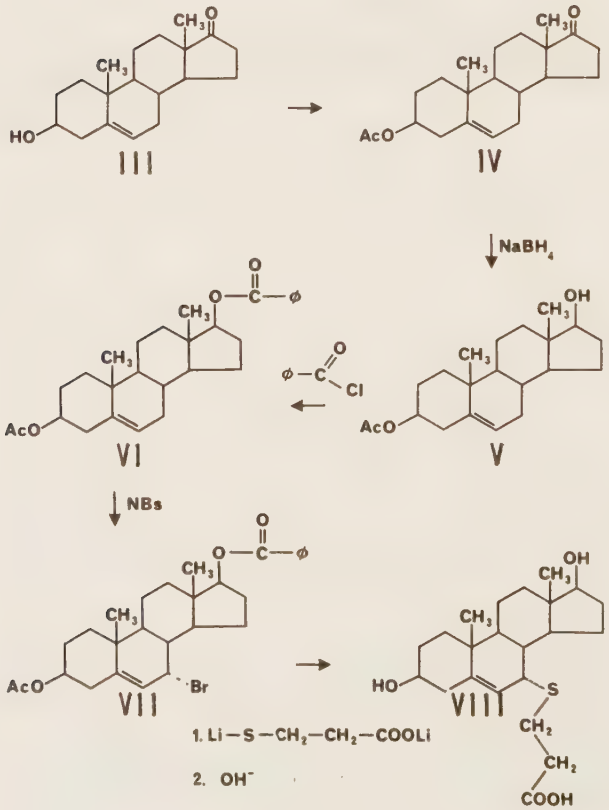


Abb.1: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 5-Androsten-3ß, 17ß-diol-3-acetat-17-acetat (II).

3.1. 3.

Synthese von 7α-Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol

Der Syntheseweg zum Hapten ist in der folgenden Abbildung als Reaktionsgleichung schematisiert.



Ausgangsverbindung für die Synthese ist 5-Androsten-3ß-ol-17-on (Dehydroepiandrosteron).
Zum Schutz der Hydroxylfunktion wird mit Essigsäureanhydrid in Pyridin verestert. Danach reduziert man die Ketonfunktion am C17 mit Natriumboranat in Ethanol. Die entstandene Hydroxylgruppe setzt man mit Benzoylchlorid nach der Einhorn-Variante zum Benzoesäureester um. Dieser wird der Reaktion mit N-Bromsuccinimid unterworfen. Auf thermischem Wege wird so selektiv in Allylstelllung zur Steroidskelett-Doppelbindung in 7-Stellung ein Bromrest eingeführt. Das relativ stabile Bromderivat wird daraufhin mit der aktivierten, metallierten Mercaptopropionsäure nucleophil substituiert. Schließlich werden die Schutzgruppen der 3- und 17-Hydroxylfunktionen durch Methanolyse abgespalten.

3.1.3.1.
Synthese von 3ß-Acetoxy-5- androsten-17-on (IV)

Die sekundäre Hydroxylfunktion des Dehydroepiandrosterons setzt man mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zum entsprechenden Acetat um. Das entstandene Derivat wird nach Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch über SiO_2 isoliert.

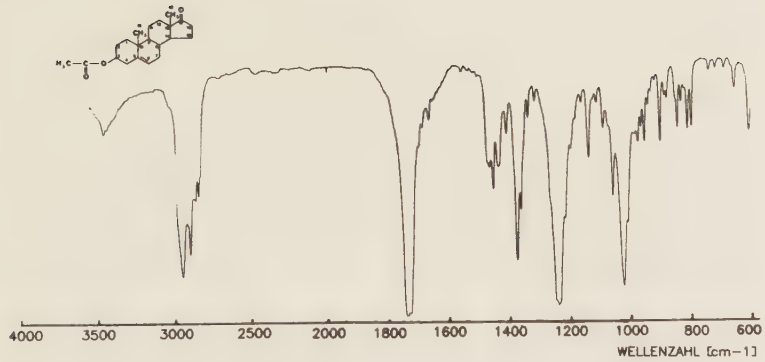
Die Verbindung kristallisiert aus einer Äther/Ethanol-Mischung. Der Schmelzpunkt der farblosen Kristalle beträgt 145°C.

Die Elementaranalyse bestätigt die erwartete Summenformel von $C_{21}H_{30}O_3$.

Man findet im 70 eV-Massenspektrum das schwerste Massenfragment bei m/e 272. Dieses (M-60)-Fragment entsteht durch Abspaltung des Acetatrestes in Form einer McLafferty-Umlagerung.

Der Vergleich des IR-Spektrums mit dem der Ausgangsverbindung beweist die Umsetzung der Hydroxylfunktion. Die Ketonbande erscheint jetzt als Dublett. Dies ist ein Hinweis auf eine weitere Carbonylfunktion im erhaltenen Derivat.

Einen weiteren Hinweis auf die eingeführte Acetoxygruppe gibt das ^{1}H-NMR-Spektrum. Dort deutet das Signal bei δ = 2.01 ppm auf die 3 Methylprotonen der eingeführten Acetoxygruppe hin.
Die Veresterung der Hydroxylfunktion bewirkt außerdem eine Tieffeldverschiebung des geminalen Protons um 1,03 ppm. Unbeeinflußt durch den Substituenten bleibt das Signal des vinylischen Protons.



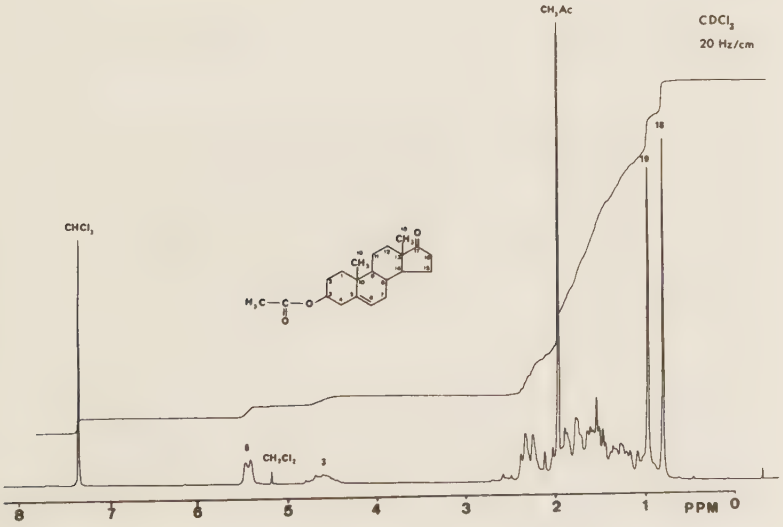


Abb. 2: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 3ß-Acetoxy-5-androsten-17-on (IV).

3.1.3.2.
Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat (V)

Reduktionen mit komplexen Hydriden laufen unter sehr milden Bedingungen mit hohen Ausbeuten ab[40-42].

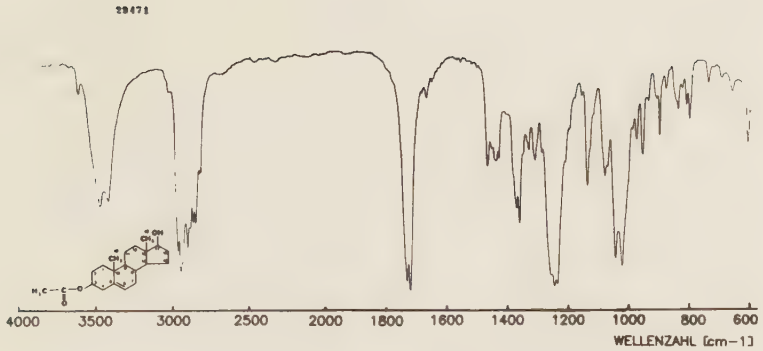
Als Reduktionsmittel für die Ketonfunktion wählt man Natriumborhydrid und arbeitet in einer 95%igen äthanolischen Lösung. Überschüssiges Natriumboranat zersetzt man nach Beendigung der Reaktion mit Eisessig.

Als Reaktionsprodukte lassen sich dünnschichtchromatographisch neben nicht umgesetztem Ausgangsmaterial zwei Komponenten im Verhältnis 80:20 erkennen. Deren Auftrennung erfolgt über präparative Dünnschichtchromatographie. Das Hauptprodukt kristallisiert aus Dichlormethan und schmilzt bei 147°C.

Die Elementaranalyse bestätigt die errechnete Summenformel von $C_{21}H_{32}O_3$.

Im IR-Spektrum deutet das breite Dublett zwischen 3400 und 3700 cm^{-1} auf eine Hydroxylgruppe hin. Die Ketogruppe des Acetylrests stellt sich weiterhin als starke Absorption bei 1735 cm^{-1} dar. Die Valenzschwingungen der Doppelbindung in 5-Stellung ist als kleiner Peak innerhalb der auslaufenden Ketonbande bei 1670 cm^{-1} erkennbar.

Zur Festlegung der sterischen Anordnung der Hydroxylfunktion gibt das ^1H-NMR entscheidende Hinweise. Aus der chemischen Verschiebung des eingeführten C17 Protons läßt sich dessen sterische Anordnung eindeutig festlegen. Man ordnet das Multiplett bei δ =3.62 ppm diesem Proton zu.
Im Androstendiol hat dieses Proton dieselbe chemische Verschiebungd.h. daß das Proton α-ständig angeordnet ist, die Hydroxylgruppe ist somit ß-ständig.



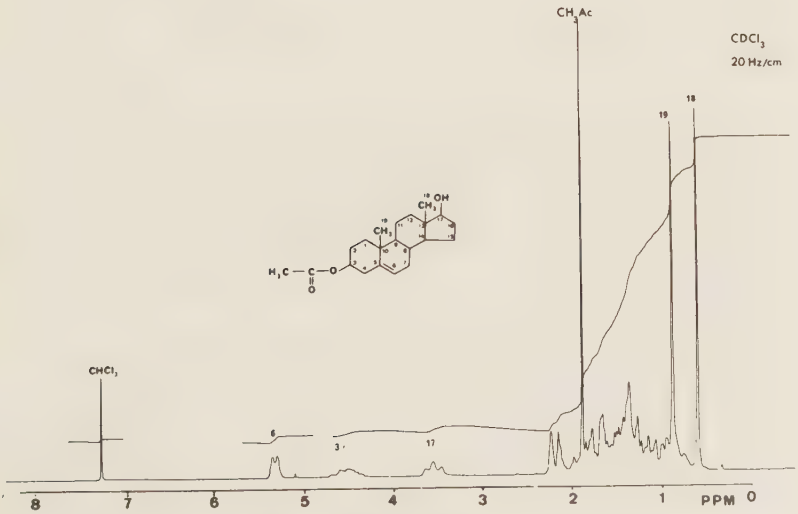


Abb. 3: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat (V).

3.1.3.3.

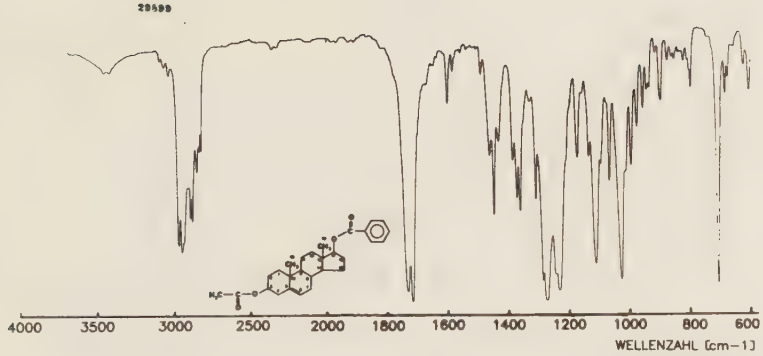
Synthese von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VI)

Die 17-Hydroxylfunktion wird nach Schotten- Baumann durch Alkoholyse mit Benzoylchlorid verestert. Eine Verseifung vermeidet man, wenn man nach der Einhorn-Variante mit Pyridin als säurebindendem Mittel arbeitet. Nach Beendigung der Reaktion wird überschüssiges Pyridin durch Säurebehandlung entfernt. Anschließendes Waschen mit $NaHCO_3$ überführt das restliche, nicht umgesetzte Benzoylchlorid in die wässrige Phase. Das Reaktionsprodukt wird säulenchromatographisch über SiO_2 isoliert. Man erhält das Derivat als farblose Kristalle mit Schmelzpunkt 175°C.

Die Elementaranalyse bestätigt die erwartete Zusammensetzung $C_{28}H_{36}O_4$.
Im Massenspektrum wird das schwerste Fragment bei m/e 376 (M-60) registriert.

Durch Vergleich mit dem IR-Spektrum der Ausgangsverbindung läßt sich die Umsetzung der Hydroxylgruppe klar erkennen. Es fehlt die breite Hydroxyl-Valenz-Schwingung im Bereich um 3500 cm^{-1} . Stattdessen findet man im Bereich der Carbonylschwingungen ein Dublett. Dies zeugt von der Existenz zweier Ketonfunktionen, nämlich der acetylischen und der benzoylischen.
Die starke Carbonylbande überdeckt fast völlig die Valenzschwingung der Doppelbindung im Steroidskelett. Sie ist jedoch noch als leichte Schulter bei 1670 cm^{-1} zu erkennen.

Im ^1H-NMR treten die Signale der aromatischen Protonen zwischen δ =7,3 ppm und 8,1 ppm auf. Die Substitution am C17 bewirkt außerdem eine Verschiebung des geminalen Protons ins tiefere Feld nach δ =4.83 ppm. Das vinylische Proton bleibt unbeeinflußt.



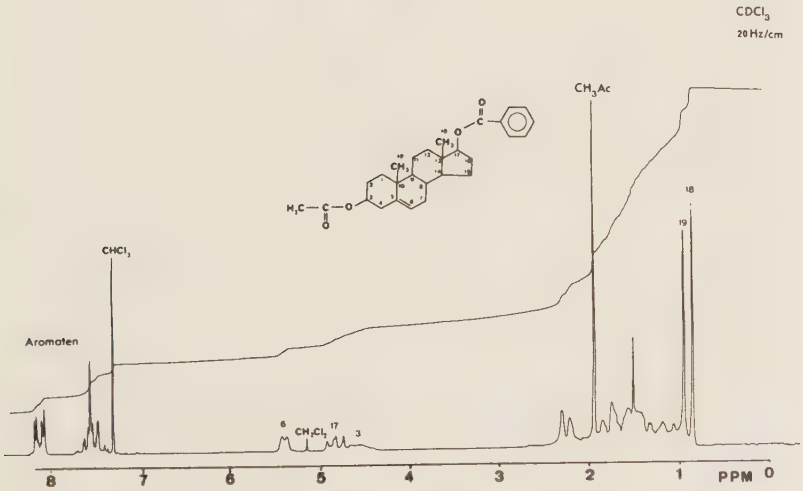


Abb. 4: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VI).

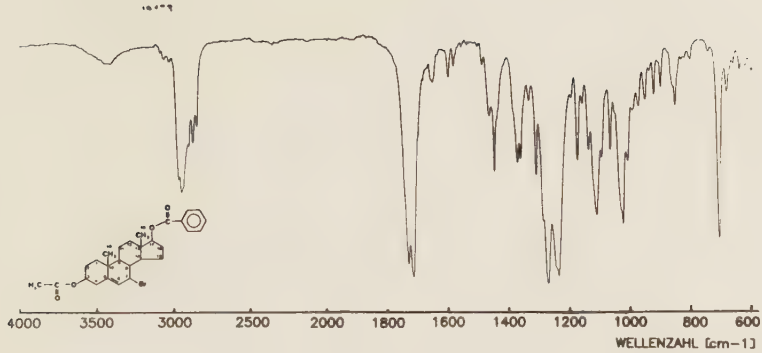
3.1.3.4.
Synthese von 7α -Brom-5-androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VII)

Methode der Wahl zur allylischen Bromierung ist die Umsetzung mit N-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff. Die Reaktion verläuft nach einem Radikalmechanismus, welcher thermisch und unter Umständen zusätzlich mit Hilfe eines Radikalstarters ausgelöst wird.
Im vorliegenden Fall wird durch Zusatz von α , α' -Azobisisobutyronitril[43] als Radikalstarter bromiert. Dabei bildet sich das Bromderivat innerhalb von 20 Minuten. Die Kristallisation des Bromproduktes bereitet erhebliche Schwierigkeiten, denn eine chromatographische Reinigung scheidet aus, weil sich das Bromderivat auf der Säule zersetzt[32]. Wichtig für die Kristallisation scheint die vollständige Entfernung des Tetrachlorkohlenstoffs aus dem Rohprodukt zu sein.
Dies erreicht man am besten durch mehrmaliges Abrotieren am Rotationsverdampfer mit Essigsäureaethylester als Schlepper. Anschließend wird aus Aether/Ethanol kristallisiert.
Die Elementaranalyse steht im Einklang mit der theoretischen Summenformel von $C_{28}H_{35}O_4Br$.

In Analogie zu allen bisher dargestellten, mit Acetat geschützten Hydroxylfunktionen erscheint im Massenspektrum nicht der Molekülpeak als schwerstes Massenfragment sondern das (M-60) Fragment bei m/e 454.

Ein wichtiger Hinweis auf die Bromsubstitution ist jedoch das Auftreten der Massenfragmente 80 und 82. Diese entstehen aus den Bromisotopen 79 und 81 als $(H^{79}Br)^+$ und $(H^{81}Br)^+$.

Die Valenzschwingung der Steroiddoppelbindung ist durch den Polarisationseffekt des Bromsubstituenten im IR nach niedrigeren Energien verschoben. Sie erscheint jetzt als deutlicher Peak bei 1655 cm^{-1}. Eine zusätzliche Bande im Bereich sehr niedriger Energien bei 705 cm^{-1} könnte der der C-Br-Valenzschwingung zugeordnet werden.



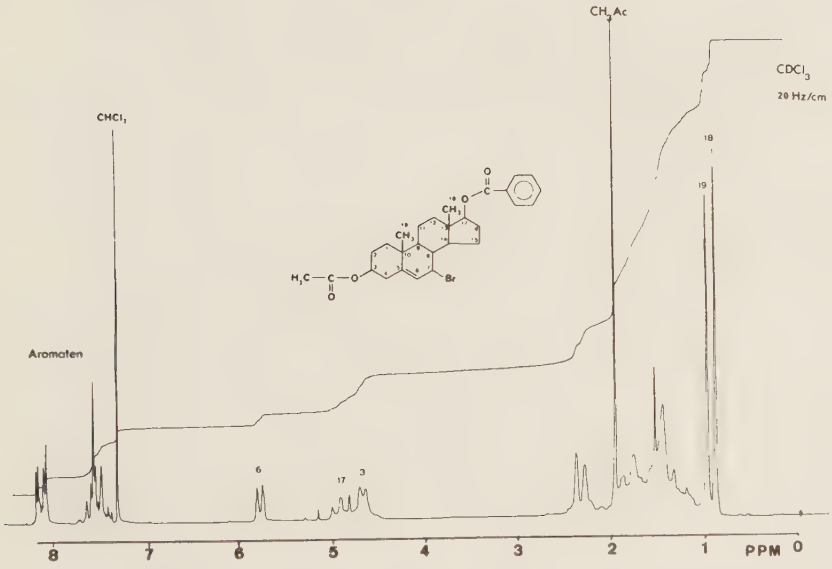


Abb.5: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 7 -Brom-5-androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VII).

Die Literatur über die sterische Anordnung von 7 substituierten Bromderivaten bei Δ 5-Steroiden ist widersprüchlich[44]. Je nach Reaktionsbedingungen werden sowohl α- oder ß-Epimere erhalten[45]. Andere Autoren erhalten ein Gemisch aus beiden möglichen Epimeren[46]. Eine Umwandlung des thermodynamisch instabileren ß-Bromderivates in das aequatoreale, stabilere α-Epimer läßt sich bereits durch Kochen in Tetrachlorkohlenstoff erzielen[86].

Die sterische Anordnung des Bromsubstituenten erklärt sich aus dem ^{1}H-NMR. Dort liefert das vinylische Proton am C6 ein Dublett. Die Kopplungskonstante beträgt J=5 Hz. Das Dublett ist die Folge der Kopplung mit dem C7-Proton. Eine Kopplung dieser Protonen ist jedoch aus sterischen Gründen nur möglich, wenn das C7-Proton ß-ständig angeordnet ist. Das bedeutet, daß im vorliegenden Derivat der Bromsubstituent in der thermodynamisch stabileren α-Stellung angeordnet ist.

3.1.3.5.

Synthese von 7α- Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß, 17ß-diol (VIII)

Die Synthese des Thioäthers erfolgt nach einer neuen, bisher nicht beschriebenen Methode unter Verwendung von n- Butyllithium als Base. Tetrahydrofuran erweist sich als optimales Lösungsmittel für die Umsetzung. Es unterstützt die metallorganische Reaktion katalytisch. Mit n-Butyllithium erreicht man bei 0° C zunächst eine Metallierung der eingesetzten Mercaptopropionsäure. Dies äußert sich durch spontane Bildung eines weißen Niederschlages nach dem Zutropfen. Die so aktivierte Mercaptopropionsäure greift nucleophil am halogensubstituierten Kohlenstoff des Steroidnucleus an und dirigiert die Reaktion in die gewünschte Richtung. Nach dem Ende der Reaktion zersetzt man überschüssiges n-Butyllithium durch Säurebehandlung. Aus der angesäuerten Reaktionsmischung extrahiert man die Thioäthercarbonsäure mit Essigsäureäthylester.

Wegen der schlechten Ausbeuten bei dieser Umsetzung wird auf die Isolierung des Reaktionsproduktes zunächst verzichtet. Stattdessen wird das Rohprodukt sofort einer Methanolyse unterzogen. Auf diese Weise werden beide Hydroxylschutzgruppen abgespalten. Jetzt extrahiert man die Säure aus angesäuertem Milieu mit Essigsäureäthylester.

Die Rohmischung wird säulenchromatographisch mit Al_2O_3 über einen Äther/Methanol-Gradienten aufgetrennt. Man erhält die Thioäthercarbonsäure als farblose Kristalle mit Schmelzpunkt 228 - 230° C.

Die Elementaranalyse bestätigt die erwartete Zusammensetzung aus $C_{20}H_{34}O_4S$.

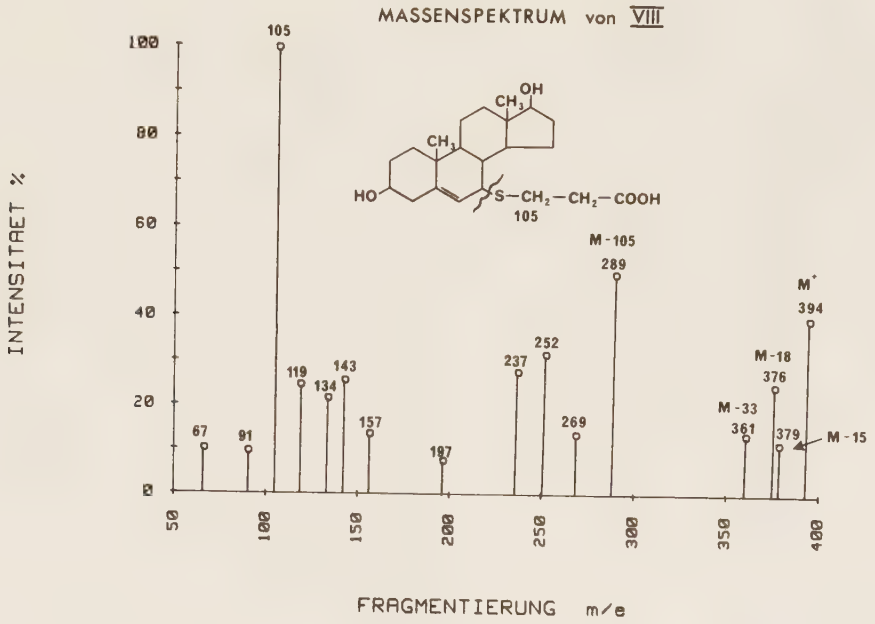


Abb.7: Massenspektrum von 7α-Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol (VIII).

Im Massenspektrum erscheint als schwerstes Fragment bei m/e 394 der Molekülpeak. Aus der weiteren Fragmentierung erkennt man bei m/e 289 die Abspaltung des Mercaptopropionsäurerestes. Dieses Fragment taucht als starker Peak bei m/e 105 auf.

Das IR-Spektrum zeigt wenig Feinstruktur. Im Bereich der OH-Valenzschwingungen deutet eine breite Bande zwischen 3100 und 3700 cm^{-1} auf die carboxylische Hydroxylgruppe hin. Innerhalb dieser breiten Bande befinden sich wohl auch die Valenzschwingungen der Hydroxylfunktionen am C3 und C17. Die starke Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} ist ein zusätzliches Kriterium für die vorhandene Carboxylgruppe. Die Valenzschwingung der Doppelbindung am C5 erscheint als starke Bande bei 1655 cm^{-1}.
Eine weitere starke Bande bei 715 cm^{-1} beschreibt möglicherweise die niederenergetische C-S-Valenzschwingung.

Im Vergleich zum ^{1}H-NMR des Androstendiols sind beim dargestellten Thioäther beide geminalen Protonen der Hydroxylfunktionen ins tiefere Feld verschoben. Bei δ = 5.68 ppm findet sich für das vinylische Proton überraschenderweise wiederum ein Dublett mit J=1.5 Hz. Die Kopplung des vinylischen Protons mit dem geminalen Proton am C7 deutet auf dessen ß-ständige Anordnung hin. Der Thioätherrest ist somit α -ständig. Die geringere Kopplungskonstante gegenüber dem Bromderivat ist wohl auf eine gewisse Ausrichtung des B-Ringes durch den Substituenten erklärbar.

Zusätzliche Informationen über die erfolgte Substitution bieten die Protonen des Propionylrestes. Aus Lage und Integration werden sie dem Singulett bei δ = 2.72 ppm zugeordnet.

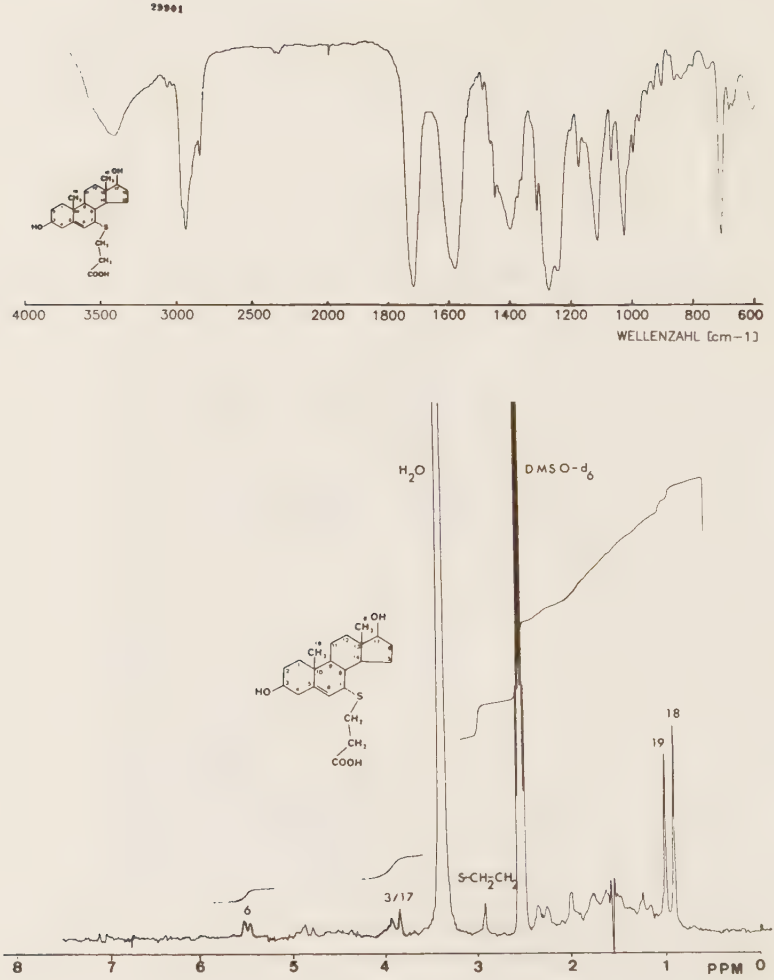
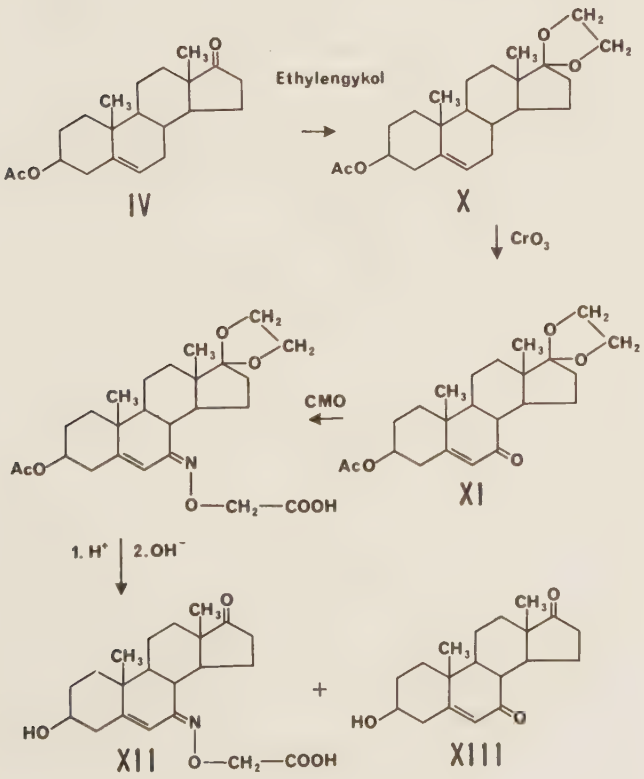


Abb.6: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 7α-Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol (VII).

3.2.

Synthese von 5-Androsten-3ß-ol-7,17-dion-7-O-carboxymethyloxim (XII)

Bei der Darstellung dieses Haptens wird ein anderer Weg beschritten. Auf oxidativem Weg führt man zunächst eine Sauerstoff-Funktion in das Steroidhormon ein. Diese Ketonfunktion wird nun per Oximbildung mit O-Carboxymethyloximhemihydrochlorid[53] als Spacer zum Oxim umgesetzt. Der Syntheseweg ist in der folgenden Reaktionsgleichung schematisiert.



Als Ausgangsverbindung für die Synthese dient 3ß-Acetoxy-5-androsten-17-on, welches als Zwischenstufe bereits bei der Synthese des vorher beschriebenen Steroidhaptens charakterisiert wurde.

Die Ketonfunktion dieses Derivats wird durch Überführung ins Ketal blockiert. Das wesentlich beständigere 1,3-Dioxolan oxidiert man selektiv in Allylstellung zur Δ 5-Doppelbindung. Diese Oxidation erweist sich als sehr kritischer Punkt. Sie gelingt mit wasserfreiem Natriumchromat in einer Eisessig/Essigsäuremischung[54].

Das entstandene Monoketon wird daraufhin in Pyridin mit Carboxymethoxylamin hemihydrochlorid[55] zum Oxim kondensiert. Auf die Isolierung dieses Produktes wird wegen geringer Ausbeuten verzichtet. Ein zusätzlicher Grund besteht darin, daß bei der protischen Entfernung des Pyridins die ketalische Schutzgruppe zum Teil in Mitleidenschaft gezogen wird. Durch Methanolyse wird deswegen aus dem Rohprodukt zunächst auch noch die Acetylgruppe abgespalten. Erst dann isoliert man die Carbonsäure.

3.2.1.

Synthese von 17,17'-Ethylendioxy-5-androsten-3ß-yl-acetat (X)

Die Darstellung des 1,3-Dioxolans erfolgt unter azeotroper Entfernung des Reaktionswassers[36-40].

Man erreicht dies durch Zwischenschalten eines Soxhlettaufsatzes zwischen Kühler und Reaktionskolben. Bei der thermischen Reaktion tropft das Kühlerkondensat in die mit wasserfreiem Kalziumsulfat gefüllte Soxhletthülse. Dabei wird das entstandene Reaktionswasser gebunden. Am Ende der Reaktion neutralisiert man und extrahiert das Reaktionsprodukt mit Benzol. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über SiO_2 isoliert.

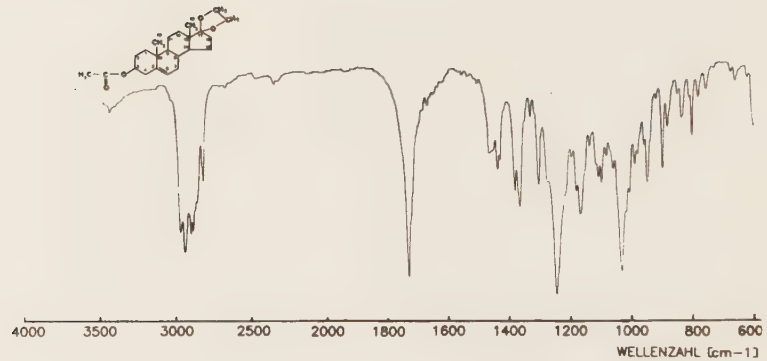
Man kristallisiert aus Äther, der Schmelzpunkt des Ketalderivates beträgt 148° C (Lit. [35] 145° C).

Die Elementaranalyse steht im Einklang mit der erwarteten Summenformel von $C_{23}H_{34}O_4$.

Wie bei allen anderen acetylisch substituierten Hydroxylfunktionen wird der Molekülpeak im Massenspektrum nicht registriert. Als schwerstes Fragment erscheint wiederum der (M-60)-Peak bei m/e 314.

Im IR-Spektrum ist das Dublett der Ketonbande, welche die beiden Ketonfunktionen der Ausgangsverbindung angezeigt hat, nicht mehr präsent. Die Ketonbande des Acetylrests wird nunmehr als starke Absorption bei 1735 cm^{-1} registriert, während sich die Valenzschwingungen der Δ 5-Doppelbindung als kleiner Peak bei 1670 cm^{-1} darstellt.

Im ^1H-NMR erkennt man aus Lage und Integration eines Dubletts (J=1.5 Hz) bei δ =3.78 ppm die vier Protonen der Ethylendioxygruppe. Das Singulett bei δ =1.97 ppm weist auf die drei Protonen der intakten Acetoxygruppe hin.



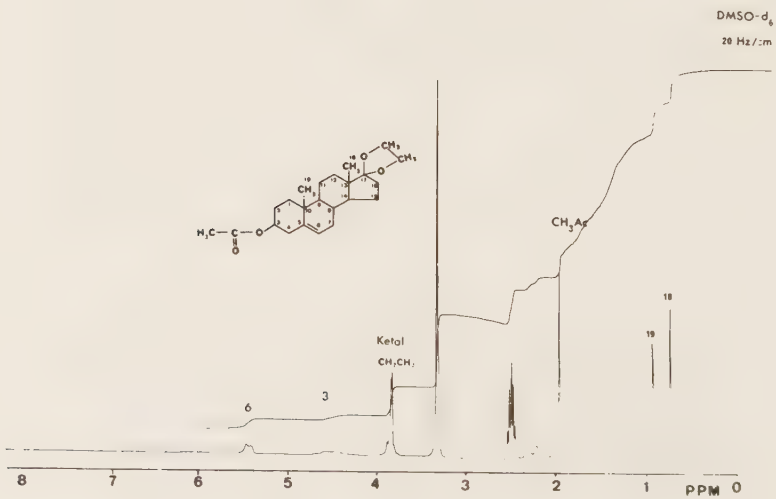


Abb. 8: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 17,17'-Ethylendioxy-5-androsten-3ß-yl-acetat (X).

3.2.2.

Synthese von 3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on (XI)

Die selektive Oxidation der Allylstellung zur Δ 5-Doppelbindung gelingt nach Marshall[54] in einer Eisessig/Essigsäuremischung. Als Oxidationsmittel wird wasserfreies Natriumchromat benutzt. Nach Beendigung dieser Reaktion wird das Reaktionsprodukt mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgefällt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch separiert und aus Methanol kristallisiert. Die leicht gelblich glänzenden plättchenförmigen Kristalle schmelzen bei 185° C (Lit.[37] 178° C).

Das Ergebnis der Elementaranalyse stimmt mit der erwarteten Zusammensetzung von $C_{23}H_{32}O_5$ überein.

Der Molekülpeak läßt sich im Massenspektrum nicht darstellen. Stattdessen wird bei m/e 328 der (M-60)-Peak als schwerstes Fragment registriert.

Die zusätzlich eingeführte Ketonfunktion ist im IR nachweisbar. Dort findet man bei 1690 cm^{-1} eine starke Bande, welche der eingeführten Carbonylgruppe zugeordnet werden kann. Die zweite Bande bei 1735 cm^{-1} beschreibt den Acetylrest. Offensichtlich durch den Konjugationseffekt mit der C7-Ketonfunktion verschiebt sich die Valenzschwingung der Doppelbindung am C5 zu niedrigeren Energien. Man findet diese Schwingung als relativ gut ausgeprägte Bande bei 1625 cm^{-1}.

Das ^{1}H-NMR schließlich bestätigt die Umsetzung am C7. Dort erscheint das Signal des vinylischen Protons mangels fehlender Kopplungsmöglichkeit mit den C7-Protonen als Singulett bei δ =5.62 ppm. Als Information über intakte Schutzgruppen dient das Dublett der Ethylendioxyprotonen bei δ =3.83 ppm, sowie das Singulett bei δ =1.97 ppm, welches die Methylprotonen des Acetylrestes repräsentiert.

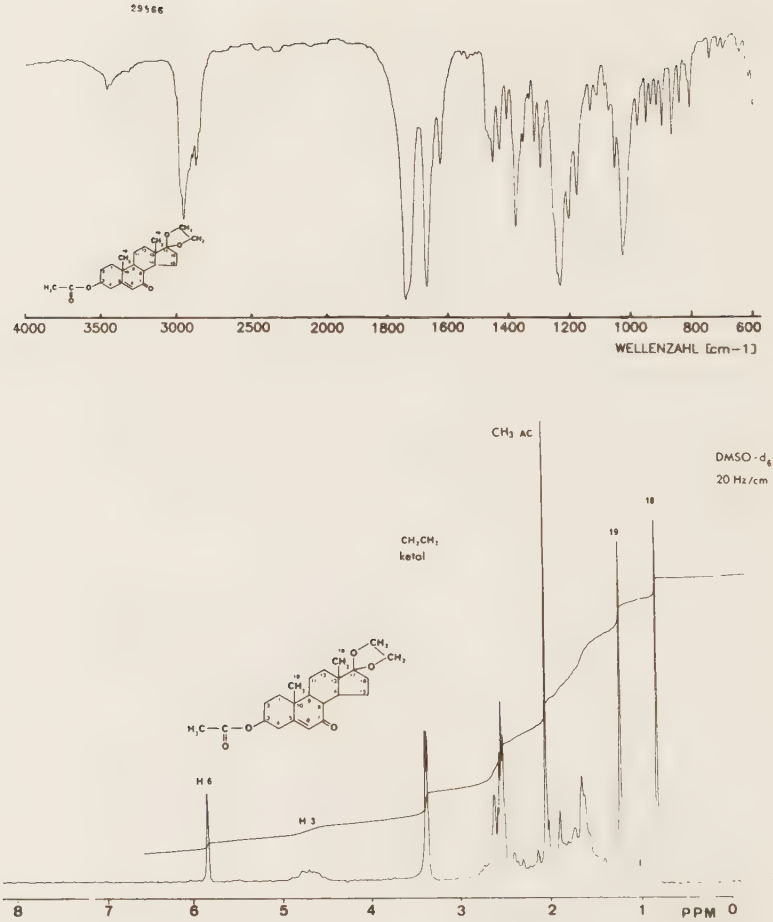


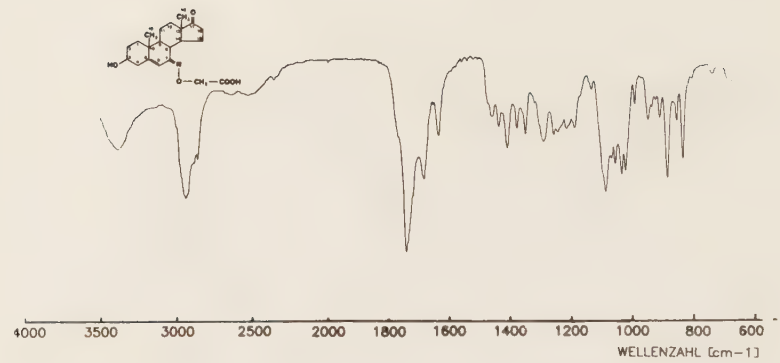
Abb. 9: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on (XI).

3.2.3.
Darstellung von 3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (XII)

Die Kondensation des Monoketons mit Carboxymethoxylamin hemihydrochlorid in Pyridin ergibt das gewünschte Oxim. Nach Beendigung der Reaktion entfernt man das Pyridin unter protischen Bedingungen. Dieser Säurebehandlung fällt jedoch auch teilweise die ketalische Schutzgruppe zum Opfer. Deshalb wird zur Komplettierung der Abspaltung zusätzlich mit para-Toluolsulfonsäure in Aceton behandelt. Wegen der geringen Ausbeute wird auf die Isolierung des Produkts verzichtet.
Stattdessen wird das Rohprodukt zur Abspaltung der Acetylschutzgruppe am C3 sofort mit methanolischer KOH behandelt.
Bei pH 5 wird die entstandene Säure mit Essigsäureäthylester extrahiert.
Man isoliert die Carbonsäure säulenchromatographisch über neutrales Al_2O_3 und kristallisiert aus Methanol. So erhält man leicht gelbliche Kristalle, welche bei 225° C schmelzen (Lit.[37] 220° C).

Die erwartete Zusammensetzung von $C_{21}H_{29}O_5N$ wird elementaranalytisch bestätigt.
Im Massenspektrum erscheint der Molekülpeak bei m/e 375 (M^+).

Entscheidende Hinweise auf die erfolgte Umsetzung liefert auch hier wieder das IR-Spektrum. Man erkennt dort eine breite, unterstrukturierte Bande im Bereich der Carbonylschwingungen. Das Maximum der Schwingung liegt bei 1740 cm^{-1}, eine weitere Bande bei 1685 cm^{-1}. Die beiden Maxima deuten auf C=O- und C=N-Valenzschwingung.



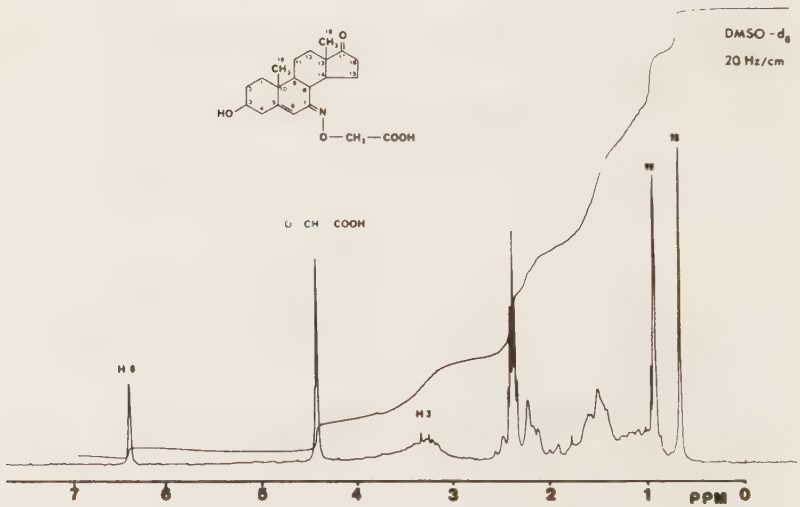


Abb. 1o: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (XII).

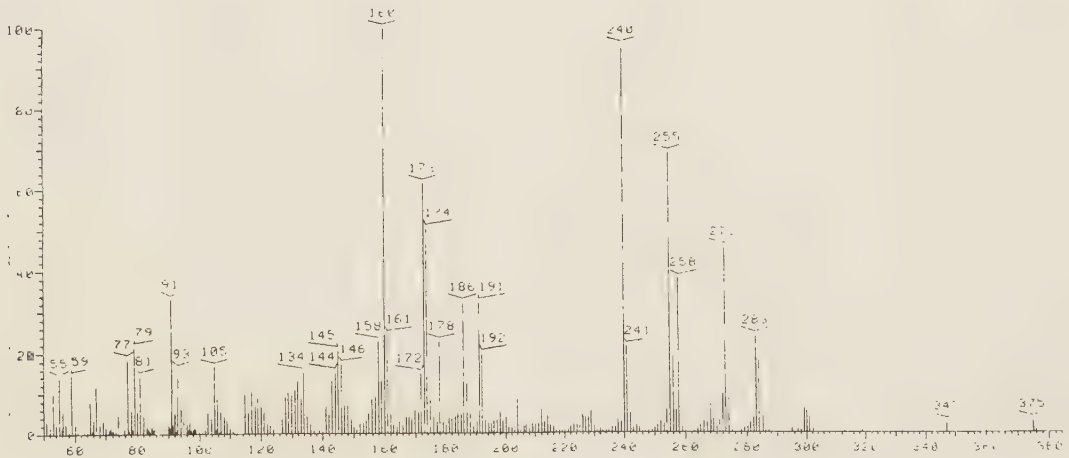


Abb.11: Massenspektrum von 3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (XII) (Ionenquellen-Temperatur : 200°C).

Wie schon beim Monoketon verschiebt sich die Bande der Doppelbindungsvalenzschwingung zu niedrigeren Energien und starker Intensität. Sowohl isolierte als auch carboxylische Hydroxylbanden sind in der breiten Absorption zwischen 3200 und 3600 cm^{-1} integriert.

Im ^1H-NMR wird das Signal bei δ =5.69 ppm dem vinylischen Proton zugeordnet. Der Singulettcharakter des Signals deutet darauf hin, daß der sp^2-Charakter am C7 erhalten geblieben ist. Wenn man als Vergleichssubstanz das Spektrum des Dehydroepiandrosterons heranzieht, erkennt man aus der Lage der chemischen Verschiebung des Dubletts bei δ = 3.66 ppm das geminale Proton der nunmehr freien Hydroxylgruppe am C3.
Einen Hinweis auf die Methylenprotonen des Oximinorestes gibt das Singulett bei 4.52 ppm.

Aus dem Vorlauf der säulenchromatographischen Trennung der Reaktionsmischung isoliert man in relativ hoher Ausbeute ein weiteres Produkt mit Schmelzpunkt 238° C.

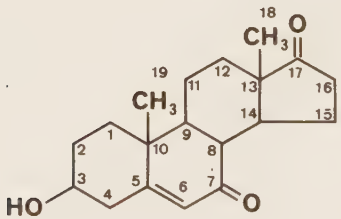
Elementaranalytisch wird bei dieser Verbindung kein Stickstoff festgestellt. Als Summenformel errechnet man $C_{19}H_{26}O_3$.

Massenspektroskopisch wird das schwerste Massenfragment bei m/e 302 registriert. Die Fragmentierung ist vergleichbar mit den Spektren der anderen Steroide.

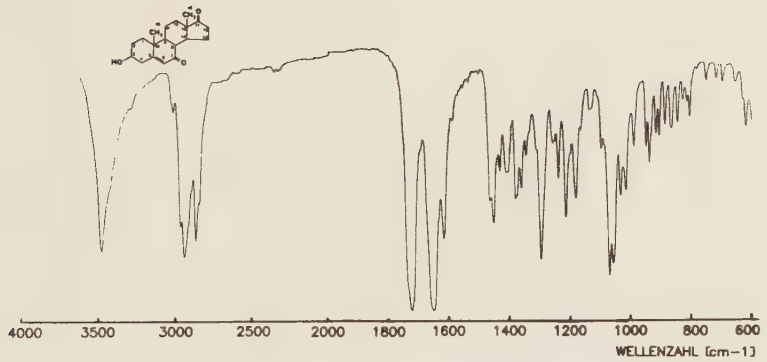
Im IR-Spektrum fallen zwei starke Banden im Bereich der Carbonylschwingungen bei 1740 cm^{-1} und 1725 cm^{-1} auf. Eine relativ scharfe Bande bei 3380 cm^{-1} deutet auf eine isolierte Hydroxylgruppe hin. Die relativ scharfe intensive Bande bei 1620 cm^{-1} könnte man der Valenzschwingung einer Doppelbindung zuordnen. Lage und Intensität dieser Schwingung könnte den Schluß nahelegen, daß ein konjugiertes System mit einer Carbonylfunktion vorliegt.

Abb.13: Massenspektrum von 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (XIII)
(Ionenquellen-Temperatur : 200°C).

Weitere Informationen zur Strukturbestimmung liefert das ^{1}H-NMR. Dort findet sich bei δ =3.66 ppm ein Multiplett, welches dem geminalen Proton einer Hydroxylgruppe am C3 zugeordnet wird. Im Bereich der vinylischen Protonen findet man ein Signal bei 5.64 ppm. Die Singulettnatur deutet auf fehlende Kopplungsmöglichkeiten mit benachbarten Protonen hin. Man könnte daraus auf eine benachbarte Ketonfunktion schließen. Bei δ =4.99 ppm findet man ein Dublett im Dublett. Diese Signale können den C8- und C16-Protonen zugeordnet werden, wenn man folgende Struktur für die Verbindung annimmt:



Die abgebildete Verbindung hat ein errechnetes Molekulargewicht von 302.4, das massenspektrometrisch ermittelte Fragment bei m/e 302 ist also der Molekülpeak. Die Summenformel bestätigt das Ergebnis der Elementaranalyse.



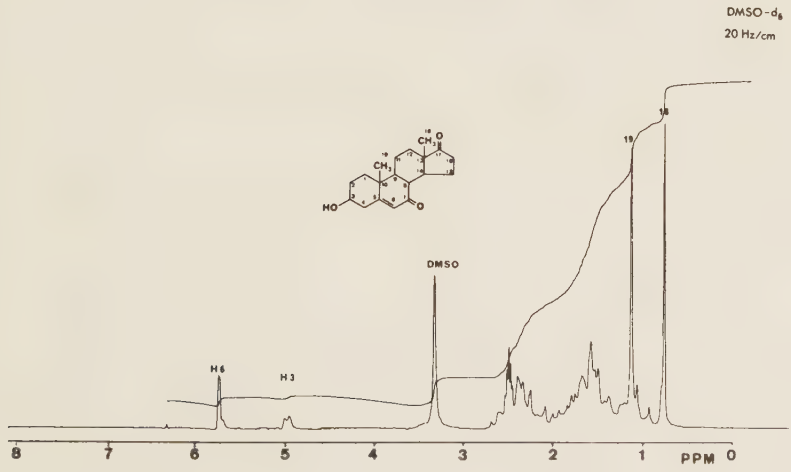


Abb.12: IR-Spektrum und ^{1}H-NMR-Spektrum von 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (XIII).

Tabelle 1: Physikalische Daten der Verbindungen I - VIII

Verb. Nr.	Summenformel	Elementaranalyse	C %	H %	Fp. °C (Lit.)	Ausbeute %	Molekular-gewicht	Molekül-peak (M^+)
I	$C_{19}H_{30}O_3$	ber	78.57	10.41	183	-	290.43	290
		gef	78.52	10.30	(181)			
II	$C_{23}H_{34}O_4$	ber	73.77	9.15	161	55	374.36	-
		gef	73.65	9.03				
III	$C_{19}H_{28}O_2$	ber	79.12	9.78	150	-	288.41	288
		gef	79.07	9.73	(149)			
IV	$C_{21}H_{30}O_3$	ber	76.33	9.15	170	64	330.42	-
		gef	76.16	9.27				
V	$C_{21}H_{32}O_3$	ber	75.87	9.70	147	35	332.44	-
		gef	75.63	9.78				
VI	$C_{28}H_{36}O_4$	ber	77.04	8.31	175	37	436.52	-
		gef	77.05	8.26				
VII	$C_{28}H_{35}O_4Br$	ber	65.11	7.03	148	45	516.51	-
		gef	65.28	7.21	(132)			
VIII	$C_{22}H_{34}O_4S$	ber	66.97	8.69	228	20	394.51	394
		gef	66.98	8.75				

Tabelle 2: Physikalische Daten der Verbindungen X - XIII

Verb. Nr.	Summenformel	Elementaranalyse	C %	H %	Fp.(°C) (Lit.)	Ausbeute %	Molekular gewicht	Molekül-peak (M^+)
X	$C_{23}H_{34}O_4$	ber	73.77	9.15	165	42	374.46	
		gef	73.6o	9.2o				
XI	$C_{23}H_{32}O_5$	ber	71.1.	8.3o	185	16	388.49	
		gef	71.o5	8.34	(177)			
XII	$C_{21}H_{29}O_5N$	ber	67.17	7.78	225	22	375.46	375
		gef	67.o3	7.84	(22o)			
XIII	$C_{19}H_{26}O_3$	ber	75.46	8.67	237	5o	3o2.4o	3o2
		gef	75.56	8.6o				

4.
Zusammenstellung und Diskussion der spektroskopischen Daten der dargestellten Verbindungen

4.1.
Infrarot-spektroskopische Daten

Die ersten Infrarotuntersuchungen an Steroiden liegen über 30 Jahre zurück. Damals untersuchten Stora und Freyman[58] molekulare Assoziationen in verschiedenen Lösungsmitteln.

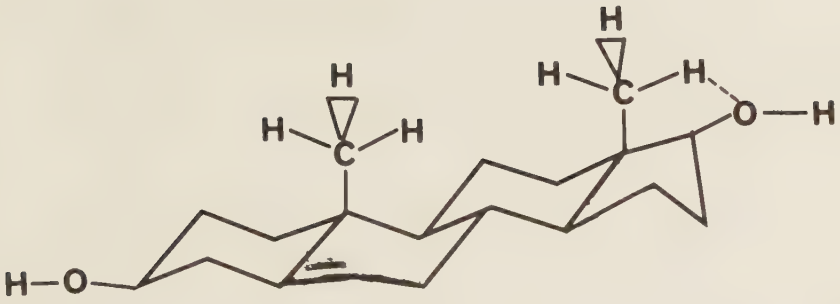
Heute liegt umfangreiches Material über die IR-spektroskopische Charakterisierung von Steroiden in Form von Spektrensammlungen vor [59-61].
Die neuerdings durch die modernen Gittergeräte mögliche hohe Auflösung liefert viele zusätzliche Details, welche in den älteren Sammlungen unberücksichtigt bleiben.

Die charakteristischen Absorptionsbanden der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Steroidderivate sind in Tab. 3 zusammengefaßt. An einigen Beispielen sollen im folgenden die wichtigsten Banden diskutiert werden.

Abb. 14 zeigt das IR-Spektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol.

Dort erkennt man eine sehr breite, grob strukturierte Bande der hydroxylischen Valenzschwingungen zwischen 3100 cm^{-1} und 3600 cm^{-1}. Diese breite Strukturierung liegt offensichtlich daran, daß im vorliegenden Molekül sowohl freie als auch über Wasserstoffbrücken assoziierte Hydroxylgruppen vorliegen. Der empfindliche Nachweis von hydroxylischen Wasserstoffbrücken im IR-Spektrum läßt sich sogar für die Konformationsanalyse der Steroide heranziehen[62].

Hydroxylgruppen im unverbrückten Zustand absorbieren in axialer Position bei etwas höheren Wellenlängen als in aequatorialer Stellung[63].



Androstendiol

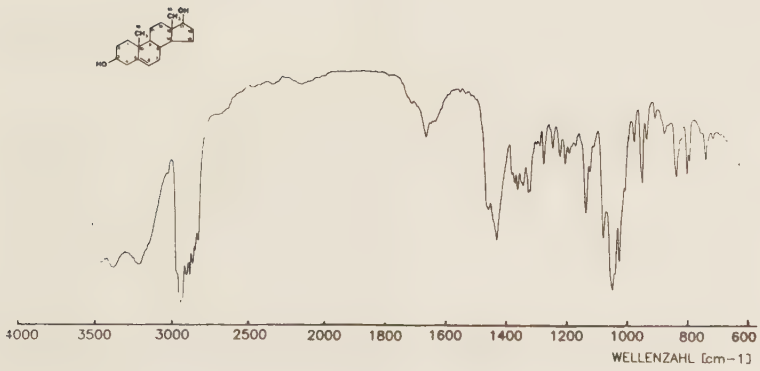


Abb.14: IR-Spektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol (I) in KBr.

Tabelle 3: Charakteristische IR-Banden (cm^{-1}) der synthetisierten Verbindungen I - XIII. (ca 1.5mg; KBr).

Verb.	ν - OH	ν - C=O	ν - C=C-	Sonstige
I	3200 - 3500 b	-	1670 sch	1380, s 1050, s
II	-	1735 ss	1670 sch	1380, s 1045, s
III	3300 - 3600	1730 s	1670 sch	1380, s 1060, s
IV	-	1740,s 1730,s	1670 sch	1370, s 1020,ss
V	3400 - 3600 b	1735 ss	1670 sch	1360, s 1045, s
VI	-	1735 1720 ss	1670 sch	1600, m 1370, s 1030, s
VII	-	1735 1720 ss	1655 m	1600, m 1365, s 1025, s 710, s
VIII	3100 - 3700 b	1725 s	1590 s	1375, s 1025, s 720, s
X	-	1730 s	1670 sch	1370, s 1035, s
XI	-	1735 1690 s	1625 m	1370, s 1030, s
XII	3300 - 3600 b	1740 1685 s	1635 m	1380, s 1025, s
XIII	3300 - 3700 b	1730 1655 s	1620 m	1380, s 1070, s

Abkürzungen: b = breit, m = mittel, sch = schwach, s = stark, ss = sehr stark

Konfigurationsbestimmungen an Hydroxysteroiden sind jedoch auch über die -C-O-Valenzschwingung möglich, welche im Gebiet zwischen 1000 cm^{-1} und 1150 cm^{-1} angesiedelt ist. Die aequatoriale Hydroxylgruppe liegt gegenüber der axialen Hydroxylfunktion bei höherer Wellenzahl, jedoch sind Struktureinflüsse auf die Bandenlage nicht sicher vorauszusehen[64].

Die sterischen Verhältnisse des vorgestellten Beispiels sind in der räumlichen Darstellung des Androstendiols in Abb. 14 aufskizziert.
So könnte man bei der Hydroxylgruppe in 17-Stellung diese intramolekularen Wasserstoffbrücken vermuten, welche das Spektrum in charakteristischer Weise beeinflussen.
Hingegen kann man die Hydroxylfunktion am C3 als isoliert ansehen.
Die Zuordnung der C-O-Valenzschwingungen gestaltet sich schwieriger. Jedoch sind die Banden um 1050 cm^{-1} und 1240 cm^{-1} bei allen Derivaten präsent, so daß diese den aequatorialen C-O-Valenzschwingungen zugeordnet werden können.

Die charakteristischen Absorptionsbanden von Kohlenstoffdoppelbindungen liegen im Infrarot-Spektrum in Bereichen zwischen 1580 cm^{-1} und 1680 cm^{-1}.
Bei Steroiden mit einer isolierten Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoffatom 5 und Kohlenstoffatom 6 kann man den Bereich zwischen 1660 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} eingrenzen[65].

Allerdings sind diese Banden nicht konjugierter Doppelbindungen von zum Teil recht geringer Intensität und eine exakte Zuordnung gestaltet sich sehr schwierig[66,67].

Solch geringe Intensität der Absorptionsbanden wird im dargestellten Beispiel sichtbar und findet sich auch bei allen Derivaten ähnlicher Strukturverhältnisse.

Halogensubstituenten mit hoher Elektronegativität, wie Fluor, Chlor oder Mercaptane verschieben die Valenzschwingung der Kohlenstoffdoppelbindung aufgrund ihres induktiven Effekts nach niedrigeren Wellenlängen. Die durch das Halogenatom verursachte Polarisation der Doppelbindung führt zu intensiverer Absorption, so daß in manchen Fällen Verwechslungen mit der nach Lage und Intensität ähnlichen Carbonylabsorption möglich sind[68].

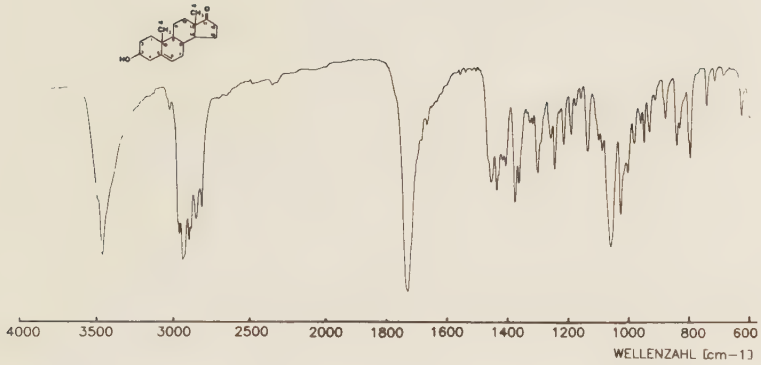
Beim 7-Bromderivat ist dieser induktive Effekt relativ schwach ausgeprägt. Wenn man jedoch das Thioätherderivat (Abb. 6) heranzieht, so ist dort die Doppelbindungsabsorption deutlich ausgeprägt. Ebenso beobachtet man eine Verschiebung zu niedrigeren Wellenlängen.

Bei Konjugation einer Carbonylfunktion mit der Kohlenstoffdoppelbindung treten auffallende Frequenzverschiebungen und Intensitätserhöhungen der Absorptionsbanden auf[71].

Ähnliche Beobachtungen werden bei stickstoffsubstituierten Verbindungen gemacht[71].

Solche Effekte sind in den abgebildeten Spektren des 3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on, sowie beim 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on und 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on-7-(O-carboxymethyl)oxim deutlich sichtbar (Abb. 9, 10, 12).

Ein einfaches Beispiel, bei dem neben einer isolierten Hydroxylfunktion noch eine Carbonylgruppe am Steroidskelett substituiert ist, stellt das Dehydroepiandrosteronsystem dar. Dessen IR-Spektrum ist als Abb. 15 dargestellt. Neben der hydroxylischen Valenzschwingung bei 3300 cm^{-1} bis 3600 cm^{-1} und deren C-O-Valenzschwingungen bei 1060 cm^{-1} lassen sich aus der Frequenzlage der Carbonylabsorptionen Aussagen über die strukturelle Umbebung gewinnen.



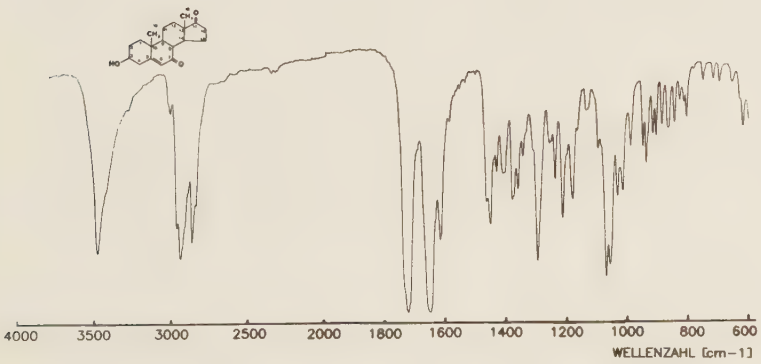


Abb.15: IR-Spektren von Dehydroepiandrosteron (oben) und 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (unten) in KBr.

Pentazyklische Ketone des D-Ringes haben ein Maximum im Bereich zwischen 1720 cm^{-1} und 1750 cm^{-1}. Hexazyklische Ketone absorbieren zwischen 1680 cm^{-1} und 1725 cm^{-1} [69]. Ein solches ausschließlich pentazyklisches Ketonsystem des D-Ringes liegt im abgebildeten IR-Spektrum des Dehydroepiandrosterons vor. Die zugehörige Bande erscheint bei 1740 cm^{-1}. Beim 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on ist im Molekül eine zusätzliche hexozyklische Ketonfunktion im B-Ring eingeführt. Deren Bande erscheint bei 1655 cm^{-1}. Eine solche Verschiebung nach tieferen Wellenzahlen steht in Einklang mit der allgemeinen Gesetzmäßigkeit, daß eine konjugierte Doppelbindung in α - oder ß-Stellung von Ketonfunktionen diese Verschiebungen bewirkt [70].

4.2.
Massenspektroskopische Daten

Bei der Ionisation organischer Moleküle im Massenspektrum ist nicht jedes Elektron mit gleicher Wahrscheinlichkeit eliminierbar. Die größte Neigung zur Abspaltung ist am Ort der größten Elektronendichte zu erwarten[78].
Aus Molekülen, die funktionelle Gruppen enthalten, werden also vorzugsweise Molekülionen gebildet, in denen die Ladung an einer dieser Gruppen zu lokalisieren ist.

Bei aliphatischen Verbindungen läßt sich der Einfluß eines Substituenten einigermaßen abschätzen.
Bei polyzyklischen Verbindungen, speziell bei Steroiden, ist dies erheblich schwieriger. Hier spielen Nachbarschaft von Ringverknüpfungsstellen und auch sterische Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Fragmentierung. Sehr häufig treten komplexe Umlagerungen auf. Außerdem üben verschiedenartige funktionelle Gruppen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Bruchstückbildung der Steroide aus[72].

Eine Zusammenstellung der am meisten aufgetretenen Fragmente ist in den Tabellen 4 und 5 dargestellt.

Erwartungsgemäß treten die Molekülpeaks der Steroidderivate im 70eV-Massenspektrum nur bei ungeschützten funktionellen Gruppen auf[73].

Abb. 16 zeigt das Massenspektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat.
Als schwerstes Massenfragment erscheint nicht der Molekülpeak sondern als Folge der Abspaltung eines Essigsäurerestes das (M-60)-Fragment. Im Sinne einer McLafferty-Umlagerung entsteht das entsprechende $\Delta^{3.5}$-Dien, falls die Abspaltung am C3 stattfindet. Die Eliminierung des zweiten Acetatrestes ergibt nach demselben Mechanismus das Ion mit m/e 254.

Tabelle 4: Fragmentierung der 17ß-Hydroxysteroidderivate im Massenspektrum (% relative Intensität)

Verb.	I	II	V	VI	VII	VIII
MG	290.4	374.5	332.4	436.5	516.5	394.5
M^+	290 (100)	-	-	-	-	394 (40)
m/e	-	-	-	376 (72)	374 (61)	376 (25)
	275 (22)	314 (100)	-	-	-	289 (50)
	272 (71)	-	272 (100)	272 (5)	269 (24)	269 (14)
	257 (33)	254 (11)	257 (21)	255 (12)	252 (72)	252 (32)
	239 (45)	239 (20)	239 (14)	239 (13)	237 (66)	237 (28)
	213 (29)	213 (28)	213 (9)	213 (12)	211 (28)	-
	205 (66)	198 (5)	201 (6)	199 (8)	195 (12)	197 (8)
	187 (23)	183 (9)	-	183 (6)	169 (10)	-
	161 (52)	159 (10)	164 (13)	159 (6)	155 (12)	157 (14)
	145 (55)	146 (34)	151 (18)	146 (19)	143 (11)	143 (26)
	133 (36)	133 (24)	133 (18)	133 (17)	-	134 (22)
	119 (44)	120 (33)	121 (38)	121 (20)	122 (10)	119 (25)
	105 (71)	105 (24)	107 (24)	105 (100)	105 (100)	105 (100)
	95 (51)	93 (24)	91 (24)	93 (10)	91 (8)	91 (10)
	81 (48)	81 (15)	79 (18)	81 (18)	80/82 (80)	81 (27)

Tabelle 5: Fragmentierung der 17-Ketosteroidderivate im Massenspektrum (% relative Intensität)

Verb.	III	IV	X	XI	XII	XIII
MG	288.4	330.4	374.5	388.5	375.5	302.4
M^+	288 (100)	-	-	-	375 (3)	302 (100)
m/e	-	-	314 (49)	284 (100)	283 (24)	284 (21)
	270 (59)	270 (100)	270 (15)	-	273 (45)	269 (12)
	255 (75)	255 (18)	252 (70)	256 (27)	258 (68)	256 (10)
	-	237 (5)	237 (16)	241 (14)	240 (95)	241 (11)
	213 (26)	213 (7)	213 (12)	-	-	-
	203 (53)	199 (8)	-	-	191 (32)	205 (16)
	159 (33)	159 (7)	157 (69)	161 (34)	160 (100)	161 (52)
	145 (32)	145 (10)	145 (8)	145 (5)	144 (20)	147 (8)
	133 (13)	131 (7)	131 (5)	134 (26)	134 (15)	134 (22)
	119 (28)	121 (50)	121 (10)	121 (9)	-	122 (10)
	107 (55)	107 (19)	105 (9)	105 (9)	105 (16)	105 (14)
	97 (44)	91 (16)	99 (100)	91 (16)	91 (33)	91 (34)
	81 (36)	79 (12)	81 (11)	79 (11)	79 (21)	79 (18)

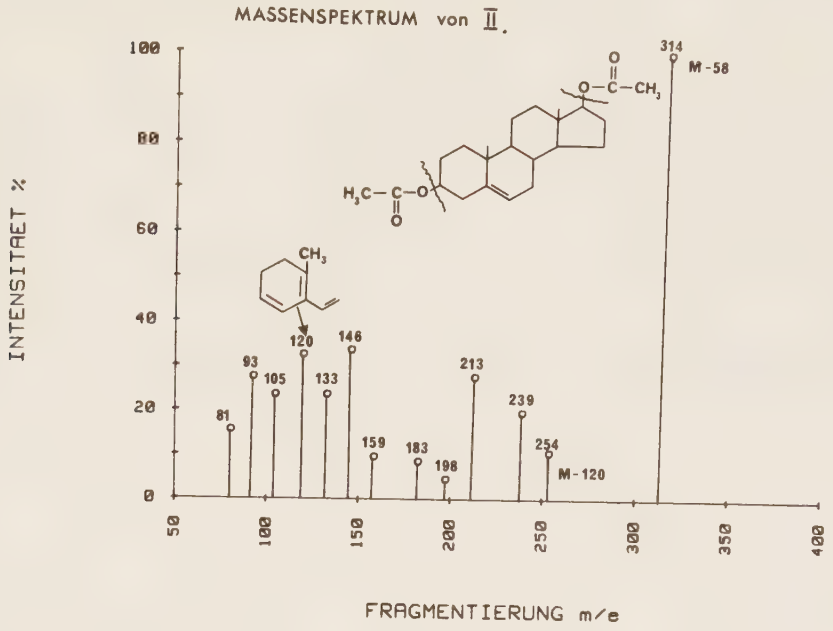


Abb. 16: Massenspektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat (II) (Ionenquellen-Temperatur : 200°C).

Daran schließt sich der Abbruch der Methylgruppe, vornehmlich C19 an[77]. Die homolytische Öffnung des D-Ringes zwischen C13-C17 und C14-C15 ergibt Ion 213 und Acetylen[77].

Das Auftreten eines Ions der Massen 119 oder 120 ist molekülspezifisch für Steroide[75]. Es ist offensichtlich das Resultat einer retro-Diels-Alder-Umlagerung am B-Ring durch Sprengung der C7-C8- bzw. C9-C10-Kohlenstoffbindungen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 17 schematisiert.

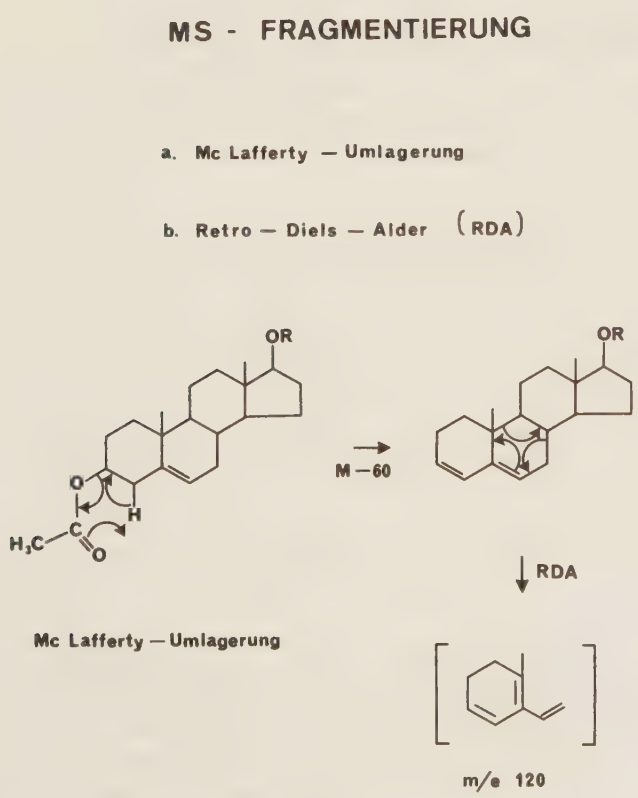


Abb.17 : Reaktionsmechanismus der häufigsten Fragmentierungen im Massenspektrum.

4.3.
^{1}H-NMR-spektroskopische Daten

Die Vorteile der kernmagnetischen Resonanz zum Studium alizyklischer Verbindungen werden teilweise durch nicht genügende Auflösung begrenzt. Jedoch konnten diese Schwierigkeiten durch die Entwicklung von Spektrometern hoher Frequenz überwunden werden[79,81].

Für Methylen- und Methinprotonen der alizyklischen Ringe beobachtet man bei Steroiden breite, überlagerte Signalgruppen, deren Zuordnung sich schwierig gestaltet.

Funktionelle Gruppen, oder deren Schutzgruppen, wie z. B. die Acetylreste treten im ^{1}H-NMR als scharfe Signale bei einer chemischen Verschiebung um 2 ppm auf.

Signale olefinischer Protonen liegen erwartungsgemäß stark separiert bei einer chemischen Verschiebung zwischen 5 ppm und 10 ppm.
Die wichtigsten chemischen Verschiebungen im ^{1}H-NMR von Protonen der dargestellten Verbindungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Abb. 18 zeigt das Spektrum von 5-Androsten-3ß,17ß-diol in Deuterochloroform.
Dort können die Signale der C18- und C19-Methylprotonen rasch zugeordnet werden. Sie erscheinen als Singuletts bei einer chemischen Verschiebung von 0.75 ppm bzw. 1.01 ppm.

Die Zuordnung der geminalen Protonen von hydroxylsubstituierten Kohlenstoffatomen gestaltet sich bereits etwas schwieriger. Durch Literaturvergleich können das Multiplett bei δ =3.55 ppm dem Proton am C3, das Multiplett bei δ =3.63 ppm dem Proton des Kohlenstoff 17 zugeordnet werden[83].

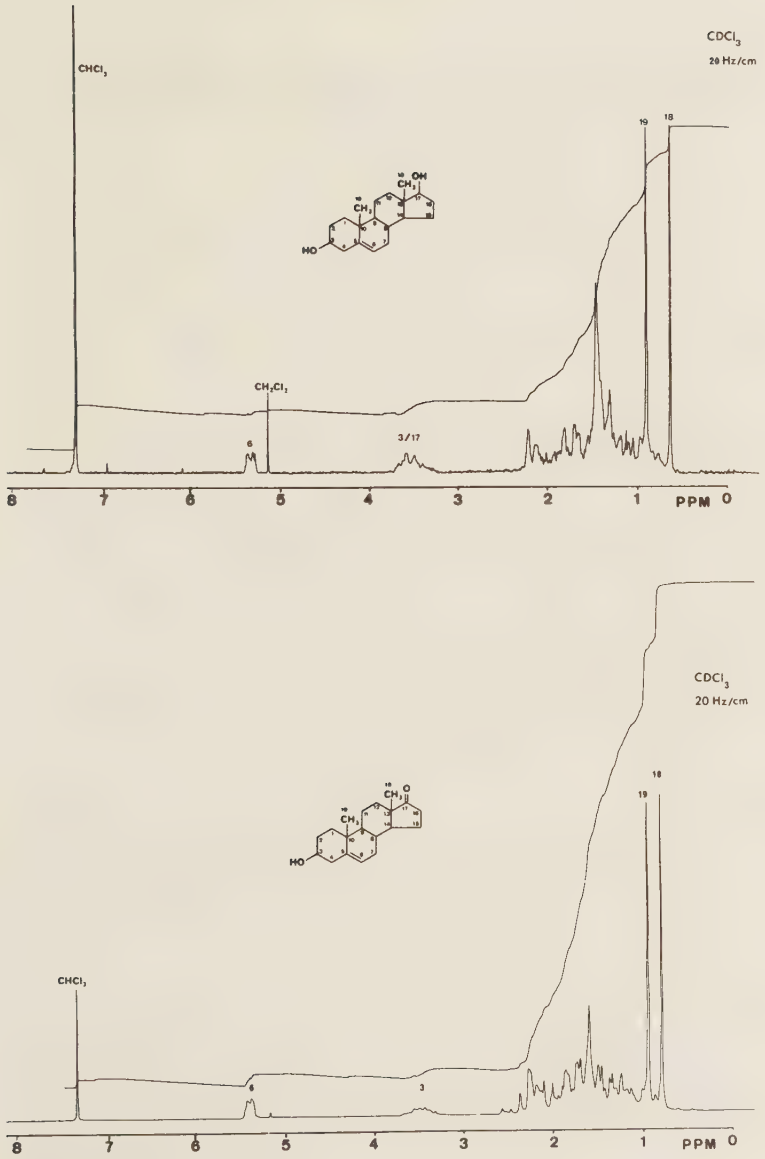


Abb.18: ^{1}H-NMR-Spektren von Androstendiol (oben) und Dehydroepiandrosteron (unten).

Die restlichen Protonen des Steroidskeletts verursachen die überlagerte Signalgruppe bei chemischen Verschiebungen zwischen 0.5 ppm und 2 ppm.

Signale aromatischer und olefinischer Protonen lassen sich im allgemeinen gut zuordnen. So auch das olefinische Proton der diskutierten Verbindung. Es bildet erwartungsgemäß ein Dublett bei δ =5.33 ppm durch Kopplung mit dem ß-ständigen Proton am Kohlenstoffatom 7, die Kopplungskonstante errechnet sich zu J=6.5 Hz.

Bei kernständigen Methylengruppen beobachtet man einen additiven Einfluß wenn verschiedenartige funktionelle Gruppen vorliegen[81,82]. Auf diese Problematik wird im Rahmen der Diskussion nicht eingegangen. Deswegen beschränkt sich die nachfolgende Tabelle auf die Zusammenstellung der wichtigsten Signale der synthetisierten Steroidderivate.

Die Veresterung der beiden ß-ständigen Hydroxylfunktionen am C3 und C17 äußert sich in einer typischen Tieffeldverschiebung der geminalen Protonen um ca. 1 ppm[83].

Zusätzliche Informationen über die eingeführten Schutzgruppen in (II) liefern die Singuletts der Acetoxyprotonen bei 2 ppm.

Analoge Ergebnisse erhält man bei der Acetylierung der Hydroxylfunktion des Dehydroepiandrosterons (III).

Bei (V) gilt es zu entscheiden, ob die bei der Reduktion entstandene Hydroxylfunktion α- oder ß-ständig ist. Aus der chemischen Verschiebung des C17-Protons dieser Verbindung läßt sich ableiten, daß es sich um ein α-ständiges Proton handeln muß.
Als Vergleich wird das Spektrum des Androstendiols (I) herangezogen.
Die Reduktion der Ketonfunktion mit Natriumboranat liefert somit ein ß-Hydroxyderivat als Hauptprodukt.

Nachfolgende Umsetzung dieser Hydroxylfunktion zum Benzoat (VI) äußert sich ebenfalls in einer Tieffeldverschiebung des H-C17α-Multipletts von 3.6 ppm nach 4.8 ppm.
Außerdem treten im ^{1}H-NMR dieser Verbindung als zusätzliche Signale ein Aromatenmultiplett zwischen 7.3 ppm und 8.1 ppm auf, was die erfolgreiche Umsetzung beweist.

Beim Bromderivat (VII) muß die sterische Anordnung des Bromsubstituenten erneut diskutiert werden.
DJERASSI[87] beschreibt bei der thermischen Bromierung von Cholesterylestern den Erhalt 7α-substituierter Bromderivate.
Seine Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Autoren[84,86], welche bei Bromierung von Δ 5-Sterolen Isomerengemische aus α- und ß-substituierten Bromderivaten erhalten.

Beim vorliegenden Bromderivat kann man den Beweis für die sterische Anordnung des Bromsubstituenten durch Betrachtungen am Molekülmodell führen.
Die Zuordnung der Signale erfolgt nach KARPLUS[88] durch Bestimder Kopplungskonstanten, welche sich aus der sterischen Anordnung des vinylischen Protons am C6 und dem geminalen Proton des 7-substituierten Kohlenstoffatoms ergibt.

Wenn der Bromsubstituent α-ständig angeordnet ist, sind die sterischen Anordnungen zwischen H-C6-C7 und C6-C7ß-H so, daß ein Winkel von etwa 35° resultiert. Also wird bei dieser Konformation durch Kopplungsmöglichkeit mit dem C7ß-Proton ein Dublett für das vinylische Proton zu erwarten sein.
Liegt jedoch ein 7ß-Bromderivat vor, so beträgt der Winkel C6-H zu C7α-H etwa 85° und man erhält ein Singulett für das vinylische Proton.

Beim erhaltenen 7α-Bromderivat findet man ein Dublett als Signal für das vinylische Proton bei 5.78 ppm mit einer Kopplungskonstanten von J=5 Hz. Somit ist der Bromsubstituent α-ständig.
Durch den induktiven Effekt des Bromsubstituenten tritt zusätzlich eine Tieffeldverschiebung um 0.36 ppm auf.

Vergleichbare Verhältnisse herrschen auch im dargestellten Thioäther. Dort wird das Signal für das vinylische Proton ebenfalls als Dublett bei 5.68 ppm registriert, allerdings mit geringerer Kopplungskonstante von 2 Hz.

Die Reaktion über die metallierte Mercaptopropionsäure ergibt offensichtlich im Sinne einer S_n1-Reaktion den sterisch weniger gehinderten und thermodynamisch stabileren α-substituierten Thioäther.

Als erste Zwischenstufe bei der Darstellung des Dehydroepiandrosteronhaptens wird ein 1.3-Dioxolan gebildet. Die Blockierung der 17-Ketofunktion via Ketal wird im ^{1}H-NMR durch das vorhandene Dublett der Ethylendioxyprotonen bei 3.8 ppm dokumentiert. Diese Signale sind vergleichbar mit den Literaturwerten für diese Schutzgruppe in 17-Stellung[84,85].

Die nachfolgende selektive Oxidation von Kohlenstoff 7 des Steroidskeletts ergibt für das vinylische Proton wegen fehlender Kopplungsmöglichkeit ein Singulett. Analoge Verhältnisse dokumentiert das Spektrum des 7,17-Diketons (XIII).

Die Oximbildung schließlich zeigt sich an zwei wichtigen Signalen:

1.) einem Singulett für das vinylische Proton,
2.) dem Signal bei 4.52 ppm, welches als Singulett die Oximino-Methylen-Protonen beschreibt[89].

Bei der Darstellung der Oxime von Steroiden werden zu 70% das anti- und zu 30% das syn-Produkt erwartet[18]. Die beiden Konformationen ergeben im ^{1}H-NMR charakteristische Verschiebungen für das Signal des olefinischen Protons. Aus der chemischen Verschiebung nach 6.58 ppm wird dem erhaltenen Oxim durch Vergleich mit den Literaturwerten[85] die syn-Konformation zugeordnet.

Tabelle 6: Wichtige chemische Verschiebungen (δ ; ppm; 90 mHz; $CDCl_3$) in den ^1H-NMR-Spektren der Verbindungen I - XIII

Signal auslösende Protonen	Methyl C18 3 H	Methyl C 19 3 H	Acetyl C3 3 H	Acetyl C17 3 H	Vinyl C6 1 H	C3 1 H	C17 1 H	Sonstige
Verbind.								
I	0.75,s	1.02,s	-	-	5.33,d J = 5 Hz	3.53,m J = 9 Hz	3.63,m J = 6 Hz	-
II	0.77,s	1.00,s	2.00,s	2.01,s	5.34,d J = 5 Hz	4.56,m J = 9 Hz	4.56,m J = 7 Hz	
V	0.73,s	1.01,s	2.00,s	-	5.35,d J = 6 Hz	4.58,m J = 10 Hz	3.62,m J = 8 Hz	
VI	0.94,s	1.03,s	2.01,s	-	5.38,d J = 4 Hz	4.59,m J = 9 Hz	4.83,m J = 7 Hz	7.30 - 8.10,m Aromaten, 5H
VII	0.95,s	1.05,s	2.06,s	-	5.74,d J = 6 Hz	4.66,m J = 12 Hz	4.90,m J = 7 Hz	7.29 - 8.10,m Aromaten, 5H
VIII (DMSO)	0.88,s	1.06,s	-	-	5.48,d J = 2 Hz	3.87,m J = 10 Hz	3.93,m J = 8 Hz	2.86,s $S-CH_2CH_2-$, 4H
III	0.86,s	1.01,s	-	-	5.35,d J = 4 Hz	3.56,m J = 6 Hz	-	
IV	0.87,s	1.03,s	2.01.s		5.38,d J = 4 Hz	4.58,m J = 9 Hz	-	
X (DMSO)	0.78,s	0.96,s	1.97,s	-	5.36,d J = 5 Hz	4.57,m J = 9 Hz	-	3.78,m $O-CH_2CH_2-O$, 4H
XI (DMSO)	0.83,s	0.99,s	1.97,s	-	5.68,s	4.63,m J = 10 Hz	-	3.83,m $O-CH_2CH_2-O$, 4H
XII (DMSO)	0.80,s	1.19,s	-	-	5.64,s	3.66,m J = 7 Hz		4.52,s $O-CH_2-COOH$, 2H
XIII (DMSO)	0.80,s	1.15,s	-	-	6.38,s	3.48,m J = 12 Hz	-	

4.4.

^{13}C-NMR-spektroskopische Daten

Die Anwendung der ^{13}C-NMR-Spektroskopie auf Steroide hat gegenüber der ^{1}H-NMR-Spektroskopie entscheidende Vorteile. Einerseits die hohe Empfindlichkeit in der chemischen Verschiebung durch strukturelle Veränderungen[92,93], andererseits kann jedes Kohlenstoffatom des Steroidskeletts oder irgendein Substituent individuell untersucht werden.

Auch für diese Untersuchungsmethode gibt es inzwischen zahlreiche Veröffentlichungen über Steroide und andere Naturstoffe.
Auch die ^{13}C-NMR-Spektren der Verbindungen II, III, IV und V sind bereits in der Literatur beschrieben[94].
Die Zuordnung der chemischen Verschiebung der einzelnen Kohlenstoffatome kann anhand dieser Quellen vorgenommen werden.

Einen Überblick über die Signalzuordnung der ^{13}C-NMR-spektroskopisch untersuchten Verbindungen gibt Tabelle 7.

Durch Vergleich mit dem Spektrum des Androstendiol-diacetats (II) können die Signale für Verbindung VI, dem Androstendiol-3-acetat-17-benzoat zugeordnet werden.
Relativ schwieriger gestaltet sich die Zuordnung der Einzelsignale im 7α -Bromderivat dieser Verbindung .
Vor allem die Zuordnung der Signale 57.3 ppm, 48.0 ppm, 42.4 ppm und 37.6 ppm zu C7, C8, C9 und C14 bereitet Schwierigkeiten. Durch Einführung des 7α -Bromrestes sind diese Kohlenstoffatome gegenüber der Ausgangsverbindung beträchtlich tief- bzw. hochfeldverschoben. Betrachtungen am Molekülmodell und Literaturangaben über 6α -Fluor- und 6α -Chlorderivate von 4-En-3-Ketosteroiden[95] lassen erwarten, daß C7 eine Tieffeldverschiebung von ca. 20 ppm erfahren müßte.

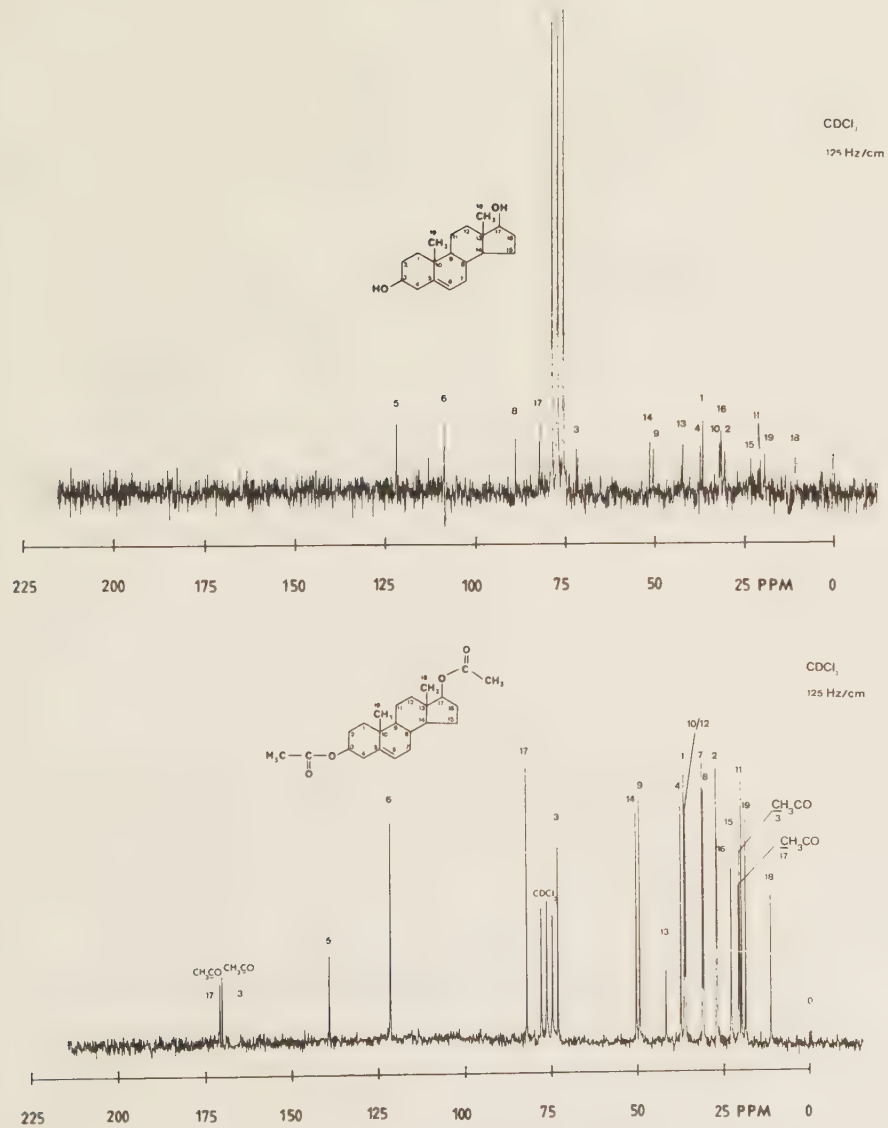


Abb.19: ^{13}C-NMR-Spektren von 5-Androsten-3ß,17-diol (oben; N_s = 63000) (I) und 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat (unten; N_s = 8000) (II) (20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, $CDCl_3$).

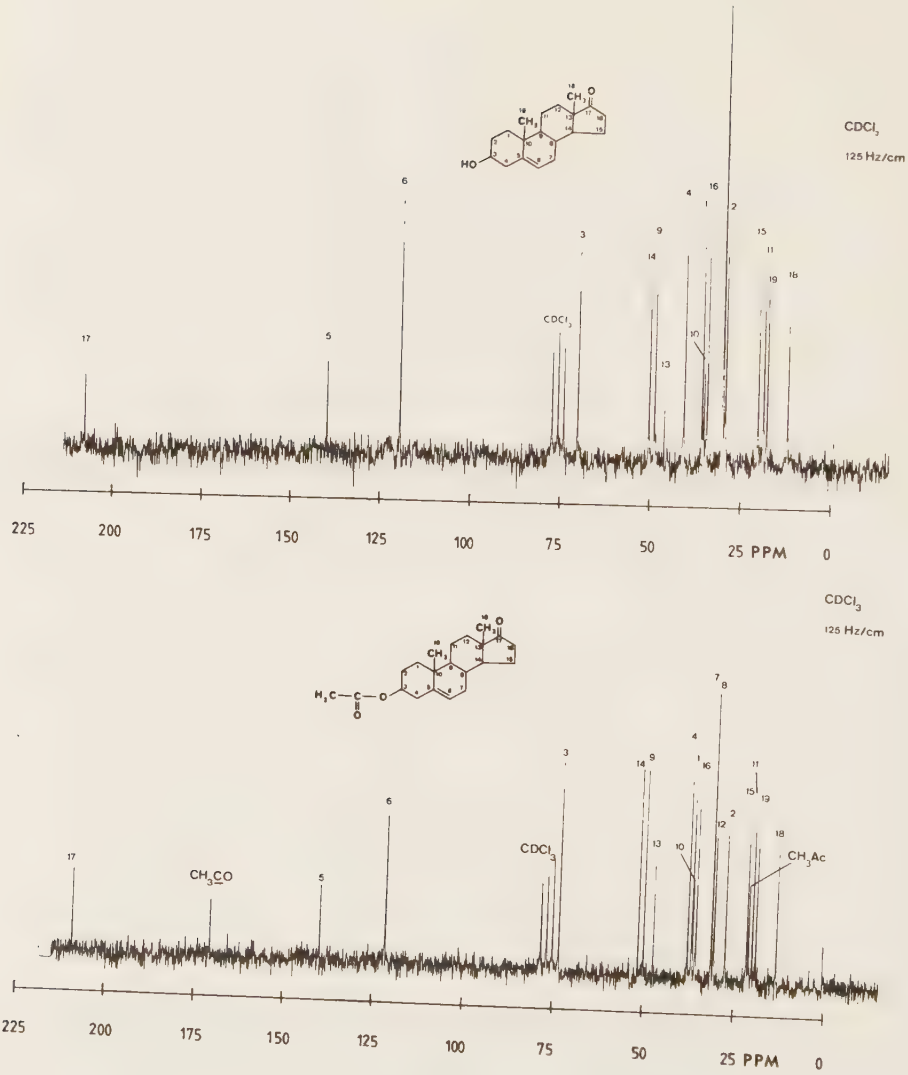


Abb. 2o: ^{13}C-NMR-Spektren von 5-Androsten-3ß-ol-17-on (oben; N_s = 8ooo)(III) und 3ß-Acetoxy-5-androsten-17-on (unten; N_s = 1oooo) (IV) (2o.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, $CDCl_3$).

Für das benachbarte C8, dessen H-Atom ß-ständig ist, wird durch direkte elektronische Wechselwirkung eine Tieffeldverschiebung von ca. 9 ppm erwartet. C9 und C14 müßten durch 1,3-diaxiale Wechselwirkung des 7α-Bromrestes mit H9 und H14 eine Hochfeldverschiebung von ca. 6 ppm erfahren[91,96].

Unter der Voraussetzung, daß 37.6 ppm ein Doppelsignal mit C4-Anteilen ist, und daß das Signal bei 48.0 ppm ein Einzelsignal repräsentiert, ergeben sich folgende Zuordnungskriterien:

Das Signal bei 57.3 ppm muß C7 zugeordnet werden, auch wenn andere Kombinationsmöglichkeiten gegeben sind. Diese erscheinen jedoch nicht sinnvoll, da sich sonst für C9 und C14 Tieffeldverschiebungen ergeben würden.

Die Zuordnung wäre in diesem Fall:

C7 - 57.3 (+25.5) ppm
C8 - 48.0 (+17.3) ppm
C9 - 42.4 (- 7.9) ppm
C14 - 37.6 (-13.5) ppm

Wenn man jedoch voraussetzt, daß das Signal bei 37.6 ppm ein Einzelsignal ist, welches C4 zugeordnet wird und daß andererseits 48.0 ppm ein Doppelsignal ist, ergeben sich folgende Kombinationen:

C7 - 57.3 (+25.5) ppm
C9 - 48.0 (- 2.1) ppm
C14 - 48.0 (- 3.1) ppm
C8 - 42.4 (+10.8) ppm

Die Zahlen in Klammern stellen die Verschiebungsinkremente bezogen auf das unsubstituierte Steroidmolekül dar.

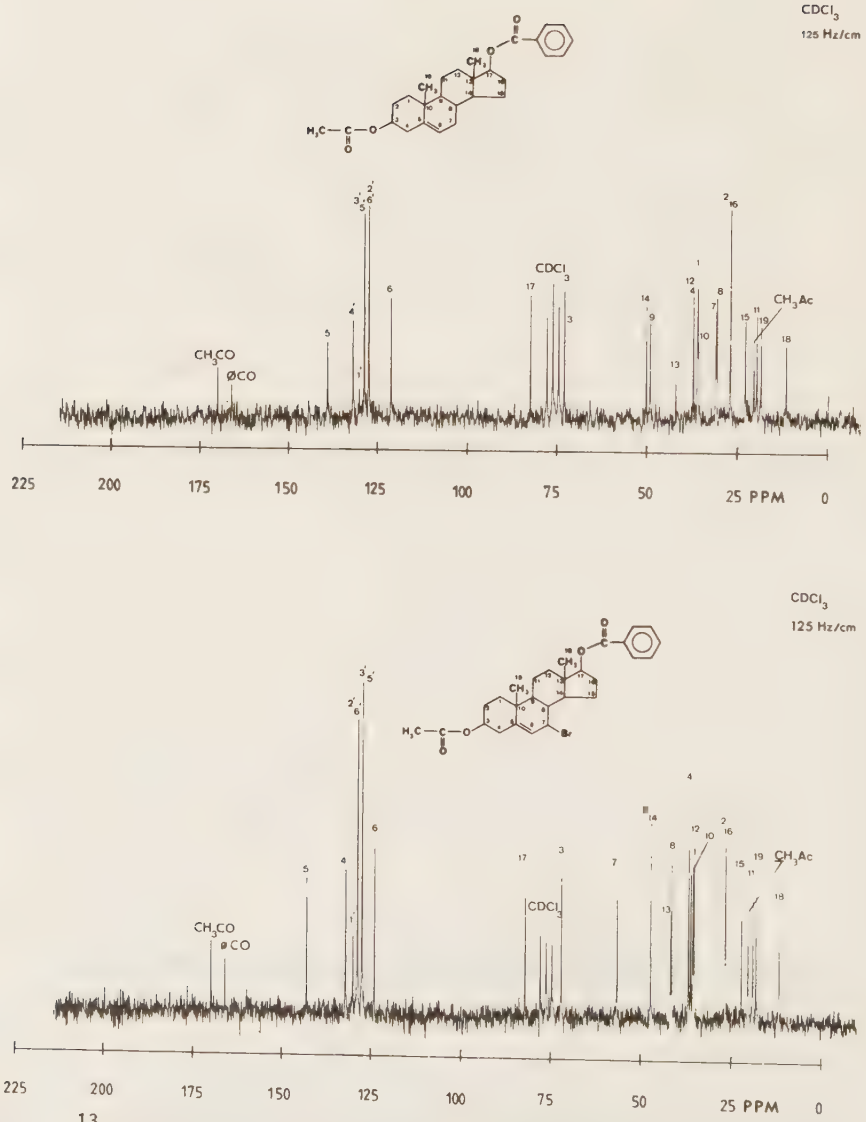


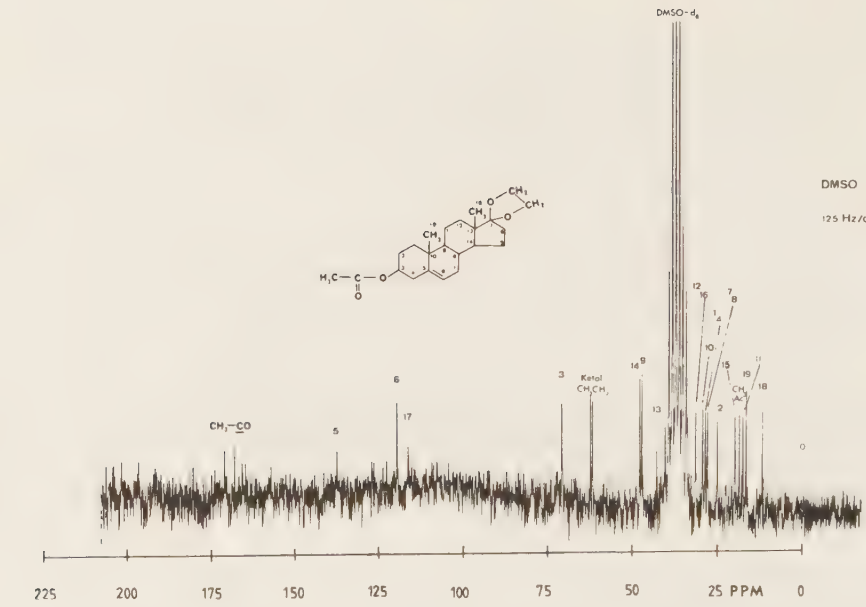
Abb.21: ^{13}C-NMR-Spektren von 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (oben; N_s = 5000) (VI) und seines 7α-Bromderivates (unten; N_s = 8000) (VII)
(20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, $CDCl_3$).

Für das C7-Signal ergibt sich durch die Bromsubstitution eine Tieffeldverschiebung um 25.5 ppm. Für C9 und C14 sind die Hochfeldverschiebungen in derselben Größenordnung. Sie sind jedoch bei Kombinationsmöglichkeit I größer als erwartet, bei Kombination II kleiner als erwartet.

Problematisch gestaltet sich auch die Zuordnung des ketalisierten C17 in Verbindung X. Entsprechend Komponente 803 bzw. 806 im ^{13}C-Atlas[97] ist dieses Signal zwischen 100 ppm und 118 ppm zu erwarten. Die Intensität ist jedoch wegen seines quartären Charakters als gering anzusehen. Höchstwahrscheinlich geht es deshalb im Rauschen unter, man könnte ihm jedoch das Signal bei 118.4 ppm zuordnen. Die ketalischen Kohlenstoffatome haben die Werte 64.5 ppm und 64.0 ppm[96].

Im ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung XIII ist das Signal für C17, welches bei 209 ppm zu erwarten wäre, nicht registriert. Für die Existenz der 17-Ketogruppe sprechen jedoch weitere Indizien, so z. B. das C18-Signal, welches bei 13.4 ppm registriert wird. Denn in den Spektren der anderen Derivate mit ähnlicher C17-Substitution erscheint das C18 bei 12 ppm - 14 ppm. Also ist bei der Registrierung dieser Verbindung offensichtlich der Schreiber zu spät eingeschaltet worden. Die Zuordnung der anderen Signale erfolgt nach Blunt und Stothers[94], welche als Komponente Nr. 39 das Androst-5-en-7,17-dion, gemessen in $CDCL_3$, vorstellen. Es können so die Signale für C5, C6, C7, C8, C9, C11, C12, C13, C14, C16, C18 und C19 zugeordnet werden.
Das Signal für C3 wird durch Vergleich mit Komponente 85, dem 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on zugeordnet.

Auf Schwierigkeiten stößt man bei der Signalzuordnung für C4 und C10, da diese im Bereich der DMSO-d_6-Signale lokalisiert sind. Eine eindeutige Zuordnung ist auch für die Signale C2 und C15 nicht möglich.



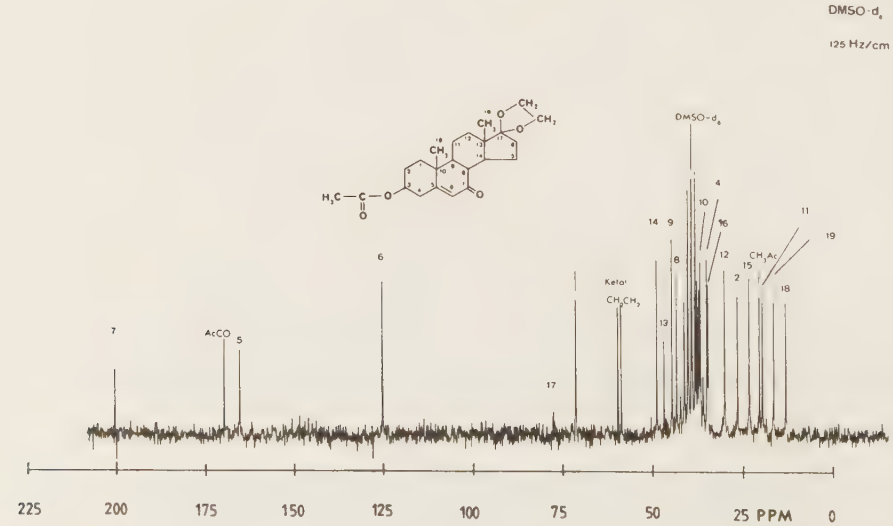


Abb.22: ^{13}C-NMR-Spektren 17,17'-Ethylendioxy-5-androsten-3ß-yl-3-acetat (oben; N_s = 65000)(X) und seines 7-Ketoderivates (unten; N_s = 57000) (XI) (20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, DMSO).

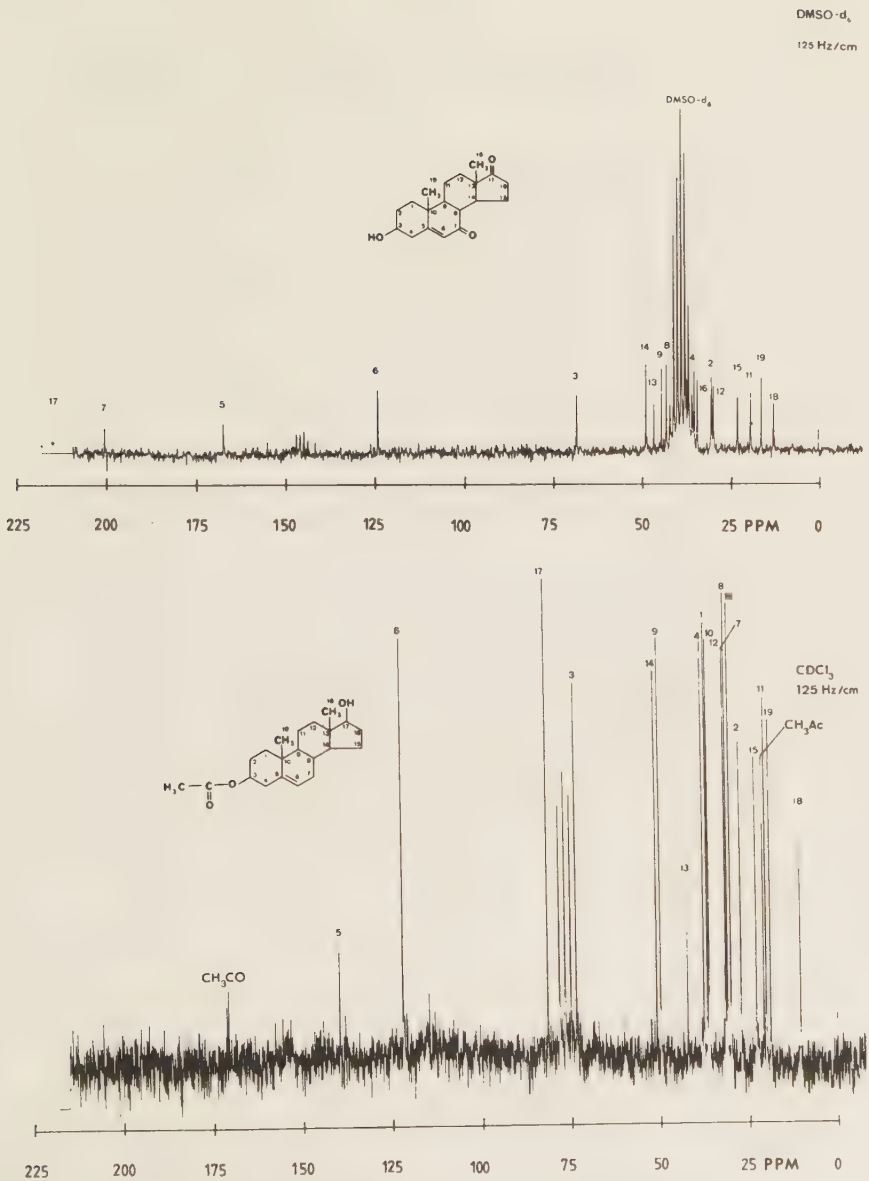


Abb.23: ^{13}C-NMR-Spektren von 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (XIII) (oben; N_s = 7500, DMSO) und 5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat (V) (unten; N_s = 15000, $CDCl_3$) (20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt).

Tabelle 7: ^{13}C-Chemische Verschiebung (ppm) der 17-Hydroxy- und 17-Ketosteroidderivate in $CDCl_3$ (2o.115 MHz)

Verb.	II	V	VI	VII	III	IV	X	XIII
C-Atom								
1	37.1	37.1	37.0	36.o	37.2	36.9	36.1	36.4
2	27.8	27.8	27.8	27.4	30.7	27.7	27.3	30.9
3	73.9	73.9	73.9	72.8	71.5	73.6	73.1	68.9
4	38.2	38.1	38.2	(37.6)	42.2	38.0	36.1	35.8
5	139.9	139.9	139.8	143.7	141.1	140.0	139.4	167.3
6	122.2	122.3	122.2	124.8	120.8	121.8	121.8	124.6
7	31.8	31.9	31.8	57.3	31.5	31.4	31.5	200.3
8	31.5	31.5	31.5	48.0	31.5	31.4	31.5	31.5
9	50.1	50.2	50.1	42.4	50.3	50.1	49.5	45.0
10	36.9	36.6	37.0	36.4	36.6	36.7	36.1	38.5
11	20.6	20.6	20.6	19.9	20.3	20.3	20.0	20.0
12	36.9	36.6	37.0	36.0	31.5	30.7	36.1	30.3
13	42.5	42.7	42.9	42.6	47.5	47.4	45.1	47.1
14	51.1	51.3	51.1	(37.6)	51.7	51.7	50.1	49.3
15	23.7	23.5	23.7	23.0	21.8	21.8	22.2	23.7
16	27.6	30.5	(27.8)	37.5	35.8	35.6	36.1	34.9
17	82.8	81.8	83.3	82.8	209.8	209.1	118.4	209.0
18	12.0	10.9	12.2	12.4	13.4	13.4	14.0	13.4
19	19.4	19.4	19.4	19.0	19.3	19.3	18.9	16.9
C3 $\underline{C}H_3CO$	170.4	170.5	170.4	170.2	-	170.4	169.5	-
C3 $CH_3\underline{C}O$	21.2	21.4	21.4	21.2	-	21.3	21.0	-
C17 $\underline{C}H_3CO$	171.1	-	-	-	-	-	-	-
C17 $CH_3\underline{C}O$	21.5	-	-	-		-	-	-
ϕ-$\underline{C}O$	-	-	163.3	163.3	-	-	-	-
Aromaten	-	-	128.3, 129.5, 130.7, 132.8 3', 5' 2', 6' 1' 4'			-	-	-
Ketal	-	-	-	-	-	-	64.5 63.9	-

4.5.
UV-spektroskopische Daten

Das UV-Spektrum ermöglicht einen begrenzten Einblick in die Elektronenkonfiguration. Sie ist ein unentbehrliches Hilfsmittel bei der qualitativen und quantitativen Analytik[98,99], im besonderen der spektroskopischen Konstitutionsermittlung[100,101].
Als Ergebnis der UV-spektroskopisch untersuchten Steroidderivate sind die Maxima der UV-Banden und der molekulare Extinktionskoeffizient in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

Bei den meisten Verbindungen ist die Kohlenstoffdoppelbindung des Steroidskeletts wichtigstes Chromophor. Deswegen liegen die UV-Maxima bei sehr niedrigen, für die Messung kritischen Wellenlängen.

α,β ungesättigte Systeme zeigen für das konjugierte System eine starke Absorption zwischen 230 und 260 nm, während die dem $n\text{-}\pi^*$ Übergang zugehörige schwache Absorption um 290 nm liegt[102,103]. Dieser Effekt ist vor allen Dingen bei den 5-en-7-Ketosteroidderivaten zu beobachten.

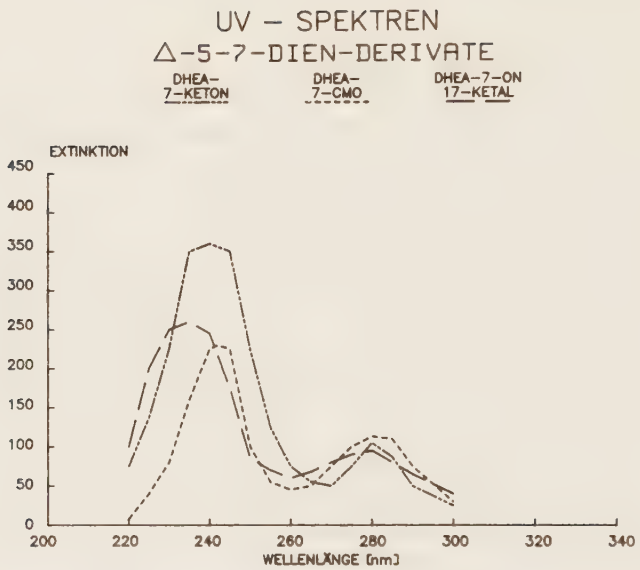


Abb.24: UV-Spektren von 3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on (DHEA-7-ON-17-KETAL)(XI) in Ethanol (Konzentration 3×10^{-5} Mol/L) 3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (DHEA-7-CMO)(XII) in Ethanol (Konzentration 4×10^{-5} Mol/L) und 3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (DHEA-7-KETON)(XIII) in Ethanol (Konzentration 3×10^{-5} Mol/L).

Tabelle 8: UV-Spektroskopische Daten der dargestellten Verbindungen

Verbindung	UV-Max. (nm)	ε	Lösungsmittel
I	214	2350	Ethanol
II	213	2420	Ethanol
III	213	2220	Ethanol
IV	214	2280	Ethanol
V	213	2470	Ethanol
VI	229	12900	Ethanol
VIII	232	7760	Wasser
X	214	2800	Ethanol
XI	245	6080	Ethanol
XII	245	6900	Wasser
XIII	238	9700	Ethanol
Androstendiol-Konjugat	240	-	Wasser
DHEA-Konjugat	258	-	Wasser

4.6
Drehwerte

Die Drehwerte werden in einer 1 cm Küvette bei 589 nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Temperatur der Küvetten wird während der Messung mittels eines Thermostaten auf 20^{o} C gehalten.

Alle Messungen werden bei c = 1 (1o mg/ml) durchgeführt.
Die Messdaten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Spezifische Drehwerte der dargestellten Verbindungen. (c = 1) (^{o})

Verbindung	$(\alpha)_D^{20}$	Lösungs-mittel	Literatur-werte
I	-60	Methanol	-
II	-62	Dichlormethan	-
III	+ 2	Dichlormethan	-
IV	- 3	Dichlormethan	-
V	-67	Dichlormethan	-
VI	- 1	Dichlormethan	-
VII	-176	Dichlormethan	-
VIII	-115	Dioxan	-
X	-177	Dichlormethan	-
XI	-423	Dichlormethan	-576 [89] (c = 0.6)
XII	-225	Dioxan	-286 [89] (c = 0.7)
XIII	-184	Dichlormethan	-

5.
Konjugation der Steroidhaptene an Rinderserumalbumin

Die Kupplung der Steroidcarbonsäure an die E-Aminogruppen der Lysinreste des Trägerproteins wird nach bewährten Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung durchgeführt. Für die Synthese von Steroid-Protein-Konjugaten wurden bisher vor allem zwei Methoden benutzt:

1. die Carbodiimid-Methode[122,123]
2. die "mixed-anhydride"-Methode[124,125]

Bei der Carbodiimid-Methode nutzt man die hohe Aktivität des Dicyclohexylcarbodiimids. Das Reagenz bildet zusammen mit dem Carbonsäurederivat zunächst ein O-Acyl-Harnstoffderivat, welches durch nucleophilen Angriff der Aminokomponente unter Abspaltung von Dicyclohexylharnstoff die gewünschte Peptidbildung ausbildet.

Beim "mixed-anhydride"-Verfahren erreicht man die Aktivierung der Carboxylgruppe durch Umsetzung mit dem N-Acyl-Aminosäure-Salz einer tertiären Base in einem inerten Lösungsmittel.

5.1.
Synthese von 7α -Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol-Rinderserumalbumin

Die Konjugation der Steroidcarbonsäure an das Trägerprotein erfolgt nach der "mixed-anhydride"-Methode von ERLANGER[48]. Danach setzt man ein Halbesterchlorid der Kohlensäure, Chlorkohlensäureisobutylester, unter Feuchtigkeitsausschluß zusammen mit der Steroidcarbonsäure zum gemischten Anhydrid um.
Die Acylierung der freien Aminogruppen des Proteinträgers erfolgt bei 0° C im wässrigen Milieu.
Als Reaktionspartner zur Bildung des Säureamids fungiert ausschließlich die ε- Aminogruppe von Lysinresten des Rinderserumalbumins[48].
Pro Mol Rinderserumalbumin sind 59 Lysinreste verfügbar. Wegen der Tertiärstruktur des nativen Proteins reduziert sich die Zahl der für die chemische Reaktion verfügbaren Lysinreste auf 35.
Erfahrungsgemäß setzt man bei der Reaktion einen Überschuß der Carboxylkomponente ein. Im vorliegenden Fall wird von einem Verhältnis von 1:2 ausgegangen. Das bedeutet, für 1 mMol Steroidcarbonsäure setzt man 0.015 mMol Rinderserumalbumin ein.
Die Reaktion wird im Kühlraum durchgeführt. Dabei wird in einem ersten Reaktionsansatz zunächst das "mixed-anhydride" durch Reaktion der Steroidcarbonsäure mit Chlorkohlensäureisobutylester hergestellt. Als Base fungiert tri-n-Butylamin in absolutem Dioxan.

In einem zweiten Ansatz werden entsprechende molare Mengen Rinderserumalbumin in Wasser gelöst, abgekühlt, und die Mischung auf pH 8.5 eingestellt.

Zu dieser Mischung tropft man das vorher präparierte gemischte Anhydrid und hält durch simultanes Zutropfen von o.5N NaOH den pH bei 8.5 .Nach Ende der Reaktion dialysiert man in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon^{R}) über Nacht gegen Wasser.
Zur Komplettierung wird mit Aceton präzipitiert und zentrifugiert.
Der Pellet wird solubilisiert und gefriergetrocknet.

5.2.
Synthese von 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on-7-(O-carboxymethyl)oxim-Rinderserumalbumin

Als Kupplungsreaktion wird diesmal die Carbdiimid-Methode gewählt. Man verwendet 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid[56] als wasserlösliches Reagenz.
Bei dieser Reaktion bildet sich nach Protonierung aus N, N-disubstituiertem Carbodiimid und Carboxylatanion zunächst ein O-acylierter Harnstoff, welcher unter Ausbildung der Amidbindung kondensiert wird.

Auch hier ist es zweckmäßig, die Carboxylkomponente im Überschuß einzusetzen, um eine adaequate Umsetzung zu erreichen.
Das Carbodiimid-Reagenz wird in einer Mischung aus DMF und Wasser aufgenommen und mit der Steroidcarbonsäure versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation fügt man entsprechende molare Mengen an Rinderserumalbumin gelöst in einem Phosphatmischpuffer hinzu und komplettiert die Reaktion durch Rühren über Nacht. Die Aufarbeitung des Konjugats erfolgt analog zur vorher beschriebenen Methodik.

5.3.
Analyse der Konjugate

Aus der Bestimmung der durchschnittlichen Zahl der kovalent an das Trägerprotein gebundenen Haptenreste läßt sich der Erfolg der Kupplungsreaktion abschätzen. Es stehen dazu folgende Methoden zur Auswahl:

1. UV-Messungen,
2. die Dinitrophenylierungsmethode nach SANGER[51],
3. die Ninhydrin-Methode nach MOORE und STEIN[52] .

Die erste Methode ist am komfortabelsten, beinhaltet jedoch einige Näherungen, die das Ergebnis verfälschen können. Bei dieser direkten Methode wird aus den UV-Spektren von Proteinträger ohne und mit haptener Determinante eine Differenzkurve errechnet. Die Differenzkurve läßt sich jedoch auch mit einem Zweistrahlphotometer direkt messen, wenn man das Konjugat gegen den freien Träger mißt.

Zur Charakterisierung des Dehydroepiandrosteron-Konjugats wird diese Methode angewandt.

Die beiden anderen Methoden sind indirekte Methoden, bei denen die nicht umgesetzten, freien Aminogruppen im Konjugat colorimetrisch bestimmt werden.
Sie finden Anwendung, wenn fehlende Chromophore im Konjgat eine UV-spektrometrische Untersuchung nicht zulassen. Aber auch Verbindungen mit isolierten Chromophoren, deren Absorptionsmaxima unterhalb 240 nm liegen, müssen nach einer dieser Methoden charakterisiert werden. Dies liegt daran, daß die Extinktion des Proteins unterhalb 240 nm steil ansteigt, und so das Extinktionsmaximum der haptenen Determinante überlagert.

5.4.

Bestimmung der Zahl der kovalent gebundenen Steroidcarbonsäurereste im Androstendiol-Proteinkonjugat

Bei diesem Hapten scheitert eine UV-spektroskopische Bestimmung daran, daß das Extinktionsmaximum der freien Säure bei relativ niedrigen Wellenlängen liegt.

Im Konjugat liegt dieses Maximum im steilen Anstieg der Extinktion des Rinderserumalbumins und läßt sich dort nicht mehr differenzieren.
Deshalb wird eine biochemische Methode zur Bestimmung der Molzahl des Steroids angewandt, welche als kommerzieller Kit zur Bestimmung des Cholesterins im Serum oder Plasma benutzt wird.
Das Prinzip dieser Reaktion ist die Oxydation des Cholesterins mit Cholesterinoxydase und Luftsauerstoff zu Δ4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol mit Hilfe des Enzyms Katalase zu Formaldehyd. In Gegenwart von Ammoniumionen bildet Formaldehyd mit Acetylaceton 3.5-Diacetyl-1.4-dihydrolutidin. Dies ist eine gelbe Verbindung, deren Farbintensität der Cholesterinkonzentration proportional ist. Die Bestimmung erfolgt photometrisch durch Messung der Extinktion bei 405 nm.

Die Reaktionsgleichung ist in Abb. 25 dargestellt.

Wegen der Identität des Cholesterins mit dem Androstendiol am Angriffspunkt der Enzymreaktion wird das Hapten derselben Reaktion unterzogen. Die Richtigkeit der Methode wird mittels selbst hergestellter Steroidhaptenstandards kontrolliert. Entsprechende molare Konzentrationen werden in einer 1 °/₀₀ Rinderserumalbuminlösung durch Verdünnen hergestellt.
Die ermittelte Eichkurve ist in Abb. 26 dargestellt.

5.4.1.
Berechnung des Steroidhaptengehalts pro Mol Rinderserumalbumin

Für die Bestimmung werden 10 mg Konjugat in 1 ml Wasser gelöst. In einer 5-fach-Bestimmung ermittelt man mit der enzymatischen Methode einen Mittelwert von 2.5 µMol Steroidkomponente.
Das bedeutet, in 10 mg Konjugat sind

$$(10-0.985) = 9.015 \text{ mg Serumalbumin}$$

Es entspricht dies einer Molzahl von 1.3×10^{-7} .

Somit errechnet sich die Molzahl an Steroidkomponente im Konjugat zu

$$2.5 \times 10^{-6}/1.3 \times 10^{-7} = 19.2 \text{ Mol}$$

Also sind im Konjugat pro Mol Rinderserumalbumin durchschnittlich 19 Mol Steroidkomponente enthalten.

REAKTIONSPRINZIP KATALASE METHODE

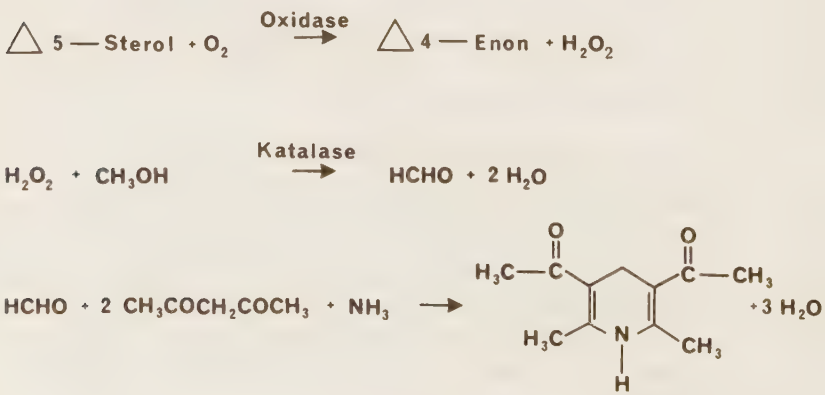


Abb.25: Reaktionsgleichung der Katalase-Methode zur quantitativen Bestimmung von Δ 5-Sterolen.

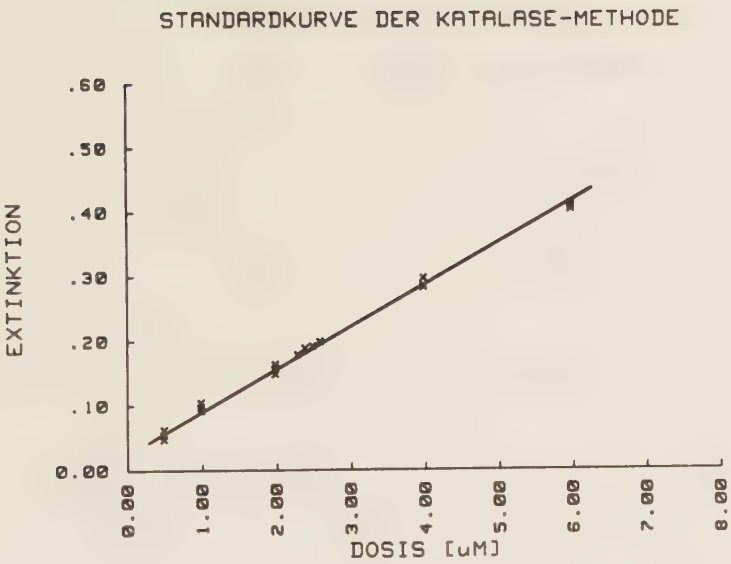


Abb.26: Eichkurve mit Androstendiol-Thioätherstandards zur quantitativen Bestimmung der Steroiddeterminante in Androstendiol-Konjugat.

5.5.
Bestimmung der Molzahl an Steroidkomponente im Dehydroepiandrosteron-Konjugat

Dieses Konjugat bildet als Chromophor ein konjugiertes System über die Doppelbindungen an C5 und C7. Es bietet sich hier eine UV-spektroskopische Analyse an, weil das Absorptionsmaximum sich an der Grenze zum steilen Extinktionsanstieg des Proteins befindet.

Die Ungenauigkeit der Methode besteht darin, daß man annimmt, der molare Extinktionskoeffizient des Steroidhaptens ist im Konjugat derselbe, wie der des freien Oxims. Daß dies nur näherungsweise gilt, geht aus dem Verlauf der Spektren hervor.
Im Konjugat nämlich ist das UV-Maximum des Steroidrestes nach kürzeren Wellenlängen verschoben. Dieser hypochrome Shift wurde bereits von WESTPHAL[57] bei dessen Untersuchungen von Steroiden in Proteinlösungen beobachtet.

Als Erklärung wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb des Molekülverbandes angenommen.

Die UV-Spektren von Rinderserumalbumin, Steroidcarbonsäure und Steroidkonjugat sind in Abb. 27 dargestellt.

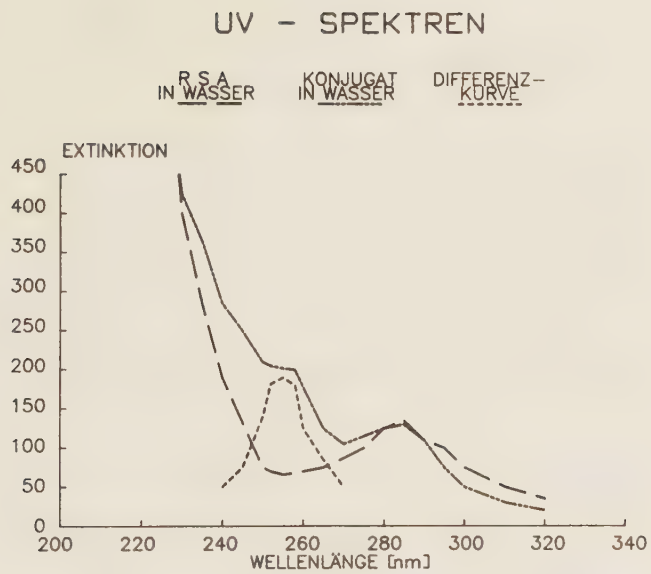


Abb.27: UV-Absorptionsspektren von Rinderserumalbumin (RSA) in Wasser ,
Dehydroepiandrosteron-Konjugat in Wasser, beide jeweils gemessen gegen Wasser
und die Differenzkurve, die man bei Messung des Konjugats gegen RSA erhält.
Konzentration: jeweils 15o mg/L .

5.5.1.
Näherungsweise Berechnung des Steroidhaptengehaltes pro Mol Rinderserumalbumin

Im UV-Maximum des freien Oxims bei 258 nm ermittelt man in Wasser als Lösungsmittel einen molaren Extinktionskoeffizienten von 13 800.
Bei Einwaage von 60 mg Konjugat/l mißt man eine Extinktion von 0.085.
Die Konzentration der Mole Steroid pro Liter sind dann 6.2×10^{-6} M/l.
Multipliziert mit dem Molekulargewicht der Steroidcarbonsäure von 375.5 sind dies 2.3 mg/l.
Subtrahiert man diese Menge von der Gesamtmenge an Konjugat ergeben sich 57.7 mg Rinderserumalbumin pro Liter.
Das Molekulargewicht von Rinderserumalbumin beträgt 69 000. Somit sind im vorliegenden Beispiel pro Liter

$$57.7 \times 10^{-3} g/69 \times 10^{3} = 8.36 \times 10^{-7} \text{ Mol}$$

Rinderserumalbumin.

Die Zahl der Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin errechnet sich dann zu

$$6.2 \times 10^{-6}/8.36 \times 10^{-7} = 7.4$$

Das Konjugat enthält also im Mittel 7 Mol Steroidcarbonsäure pro Mol Rinderserumalbumin.
Mit der bereits beschriebenen enzymatischen Methode ermittelt man 6 Mol Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin.

Vergleicht man beide Kopplungsmethoden miteinander, findet man ähnliche Verhältnisse wie andere Autoren[90,91].

Ganz offensichtlich liefert die Anhydrid-Methode bessere Kupplungsergebnisse.

6.
Immunologische Untersuchungen

6.1.
Antigen-Antikörper

Die Antikörper sind ein Teil des Immunsystems des Körpers. Sie dienen der Abwehr körperfremder Stoffe. Gelangen vom Organismus als fremd erkannte Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 1000 in den Körper, so werden von Lymphozyten, sogenannten B-Zellen, Antikörper gebildet mit dem Ziel, die eingedrungenen Fremdstoffe durch Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zu neutralisieren[103,104].

Als Antikörper fungieren im Blutplasma gelöst vorliegende Immunglobuline der Klassen IgG und IgM. Diese beiden Immunglobuline weisen unterschiedliche Struktur auf. Während das IgG Y-förmige Struktur aufweist, ist das IgM sternförmig aus 5 IgG-Molekülen aufgebaut.

Die unterschiedlichen Spezifitäten der Immunglobuline beruhen auf der Variabilität im N-terminalen Teil der H- und L-Ketten des IgG.
Je zwei dieser H-Ketten und L-Ketten sind im IgG-Molekül über Disulfidbrücken miteinander verbunden.
Die Strukturvariabilität ist eine Folge unterschiedlicher Aminosäuresequenzen.
Die beiden Spitzen am oberen Schenkel des "Y" bilden die variablen antigenspezifischen Abschnitte. Hier werden die komplementären Strukturen des Antigens, die sogenannten immunodeterminanten Gruppen, in Form einer "Schlüssel-Schloß"-Reaktion gebunden[105].
An der Antigen-Antikörper-Bindung sind wahrscheinlich elektrostatische Bindung, Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Bindung, "chargetransfer-Bindung" und van-der-Waals Kräfte beteiligt.

Antikörper lassen sich aus dem Serum von Tieren, z. B. Kaninchen, Ziege oder Esel gewinnen. Zur Immunisierung werden dem Tier die Antigene zusammen mit sogenannten Adjuvantien appliziert. Nach einigen Wochen ist das Immunsystem aktiviert. Durch erneutes Zuführen von Antigenen, sogenannte Booster-Injektionen, wird die Wirkung auf das Immunsystem potenziert.
Über die Dauer der Immunisierung herrschen unterschiedliche Auffassungen und auch die Technik der Immunisierung ist sehr variabel [106-108].

6.2.
Immunisierung

In der vorliegenden Arbeit wird nach der Methode von VAITUKAITIS[109] immunisiert. Man verwendet je 6 weibliche weiße Neuseeländerkaninchen pro Steroidkonjugat.

Die Tierversuche sind unter AZ 37-9552 vom Veterinäramt des Regierungspräsidiums genehmigt.

Als Anfangsdosis werden 0,5 mg Antigen pro Kaninchen appliziert. Man löst dazu die entsprechende Menge Konjugat in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung auf. Diese Lösung wird mit 1 ml Freund's complete adjuvant zu einem Gesamt - volumen von 2 ml suspendiert.
Man injiziert 1,5 ml dieser Suspension subkutan an mehreren Stellen auf dem Rücken des Kaninchens. Die restlichen 0.5 ml der Suspension werden intramuskulär in einen Hinterlauf gespritzt.
Die Booster-Injektionen werden in dreiwöchigen Abständen durchgeführt. Man benutzt dazu dieselbe Technik und dieselbe Menge an Antigen. Als Adjuvans wird jedoch Freund's incomplete adjuvans verwendet.

6.3.
Charakterisierung der erhaltenen Steroidantiseren

Die erhaltenen Antiseren werden durch

Antikörpertiter
Affinität
und Spezifität charakterisiert.

6.3.1.
Bestimmung des Antikörpertiters

Nach jeder Boosterung werden dem Kaninchen durch Punktion der marginalen Ohrvene ca. 0.5 ml Blut entnommen. Durch Zentrifugation bei 800 g werden die festen Bestandteile sedimentiert. Das erhaltene Serum wird mit 0.1%iger Gelatine-Phosphatpuffermischung verdünnt.
Der Antikörpertiter wird nun bei mehreren Antiserumverdünnungen zwischen 1:100 und 1:1000 getestet. Dazu werden die einzelnen Verdünnungen mit einer fixen Konzentration (40 pg) radioaktiv markiertem Antigen (Steroid) in einem fixen Volumen an definiertem Gelatinepuffer inkubiert. Die Inkubationszeit wird auf 16 Stunden festgelegt. Mit einer definierten Trenntechnik werden freie und antikörpergebundene Radioaktivität abgetrennt. Als radioaktives Steroid verwendet man zweifach tritiiertes Androstendiol bzw. Dehydroepiandrosteron.
In Abb. 27 und 28 sind die Bindungsverhältnisse der erhaltenen Antiseren bei einer 1:500 bzw. 1:100 Verdünnung des Antiserums dargestellt.
Aus Abb. 28 ist ersichtlich, daß das erhaltene Antiserum nur sehr wenig Dehydroepiandrosteron zu binden vermag. Offensichtlich ist das eingesetzte Antigen, 3ß-Hydroxy-17-oxo-5-androsten-7-on-7-(O-carboxymethyl)oxim-Rinderserumalbumin nicht in der Lage, das Immunsystem des

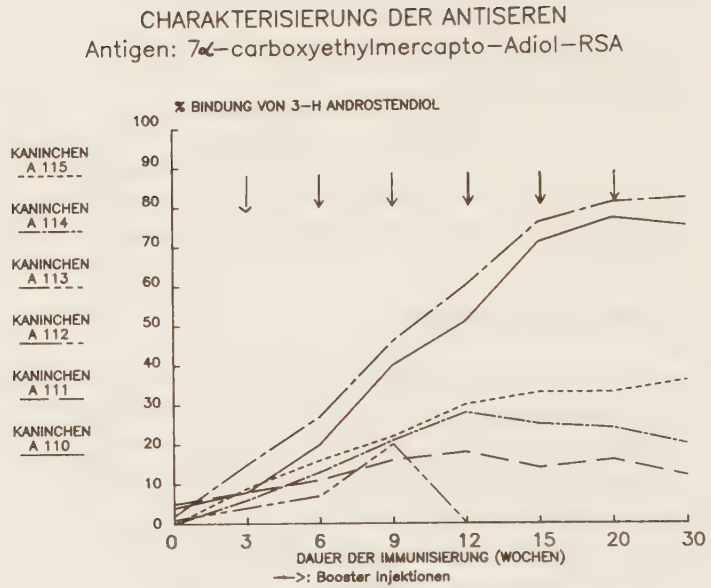


Abb.27: Charakterisierung des Antiserumtiters nach Immunisierung mit dem Androstendiol-Konjugat.
Die Bindungskurven sind bei einer Antiserumverdünnung von 1:5oo ermittelt.
Die Pfeile dokumentieren den Zeitpunkt der Booster-Injektionen bzw. der Blutentnahmen.

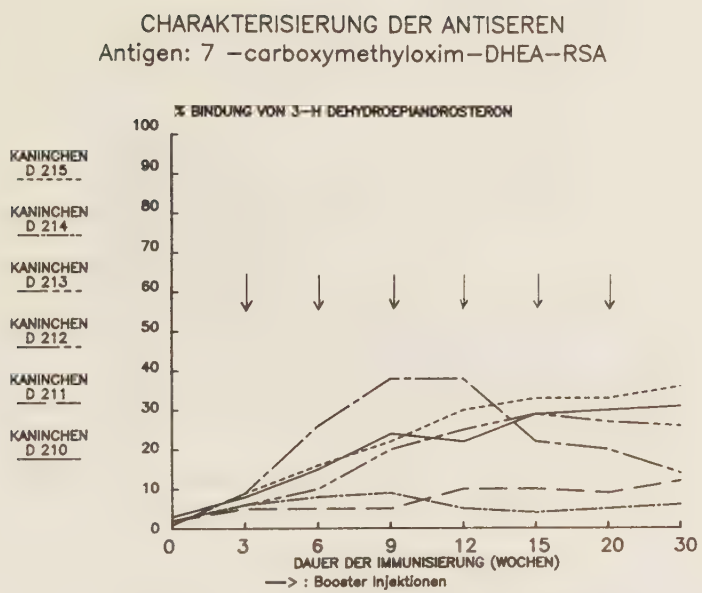


Abb.28: Charakterisierung des Antiserumtiters nach Immunisierung mit dem Dehydroepiandrosteron-Konjugat.
Die Antiserumverdünnung beträgt 1:1oo.

Kaninchens so zu aktivieren, daß Antikörper hinreichender Affinität gegen die Determinante, 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on, produziert werden.

Dies könnte möglicherweise an der geringen Anzahl an kovalent gebundenem Steroidhapten im Konjugat liegen. Solch ursächlicher Zusammenhang muß jedoch nicht unbedingt bestehen, da bereits Antikörper gegen Progesteron bei Verwendung eines Konjugats mit 6 Mol Steroidhapten pro Mol Rinderserumalbumin gewonnen werden konnten[110].

Die Immunisierung einer zweiten Serie von Kaninchen mit diesem Konjugat erbrachte analoge Ergebnisse.

Das Resultat der Immunisierung gegen das Androstendiol-Konjugat gestaltet sich erfreulicher. Bei zwei Kaninchen war der Antikörpertiter nach 15 Wochen so angestiegen, daß bei einer Antiserumverdünnung von 1:500 80% des eingesetzten radioaktiv markierten Hormons gebunden werden.
Diese Antiseren scheinen die Kriterien zum Einsatz im Radioimmunoassay zu erfüllen. Sie werden im weiteren näher charakterisiert.

6.3.2.
Reaktionskinetik der Antigen-Antikörper-Komplexbildung

Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes hängt von der Größe der Assoziationskonstanten, von der Konzentration der Reaktionspartner und der Reaktionstemperatur ab.
In Abb. 3o ist am Beispiel des Androstendiols die Abhängigkeit der Komplexbildung von der Zeit und der Reaktionstemperatur dargestellt.
Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei variabler Temperatur etwa gleich. Die Gleichgewichtslage ist jedoch bei niedrigerer Temperatur zu Gunsten des Antigen-Antikörperkomplexes verschoben.

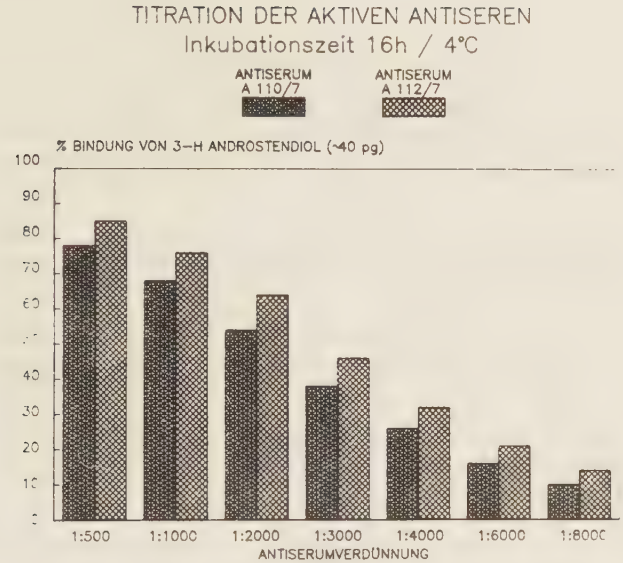


Abb.29: Bindungsstudien zur Festlegung der optimalen Antiserumverdünnug für den RIA.

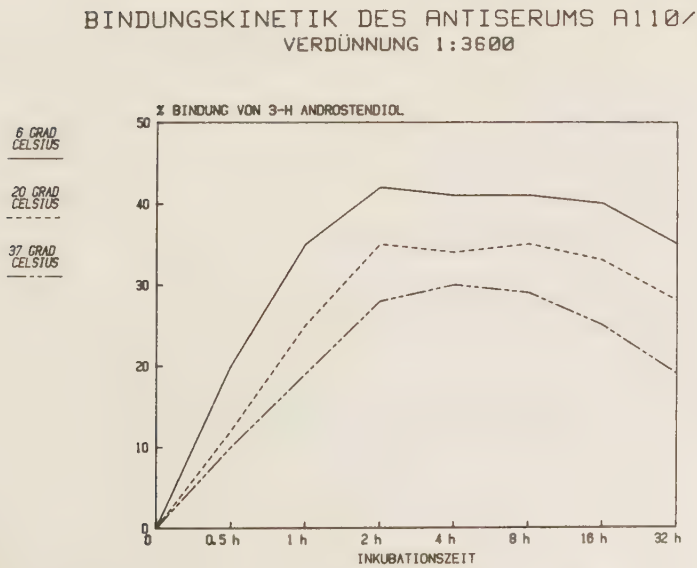


Abb.3o: Bindungsstudien zur Festlegung der optimalen Inkubationsbedingungen für den RIA

6.3.3
Bestimmung der Assoziationskonstanten der Antiseren

Beim vorliegenden System handelt es sich um ein Gemisch aus Populationen verschiedener Antikörper mit höherer und niedriger Affinität.
Die Affinität, oder besser Assoziation beschreibt die Fähigkeit des Antiserums das Antigen in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration zu binden.
Zur Abschätzung der Assoziationskonstanten werden die Bindungsstellen am Antikörper in Form sogenannter "Sättigungsanalysen" titriert.
Die Analytik wertet die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper quantitativ aus:

Antigen	+ Antikörper	⇌	Antigen-Antikörper-Komplex
(Ag)	(Ak)		(AgAk)

Grundlage für die Berechnung bildet das Clark'sche Modell[114].

Dort sind wichtige Voraussetzungen:

1. Die Interaktion von Antigen und Antikörper ist reversibel, d.h. die Assoziation ist bimolekular, die Dissoziation ist monomolekular.
2. Alle Antikörper haben in etwa dieselbe Affinität zum Antigen und beeinflussen einander nicht.
3. Bei der Messung befindet sich das System im Gleichgewicht.
4. Nur wenig Antigen wird gebunden.

Wenn man nun das Massenwirkungsgesetz (MWG) und das Massenerhaltungsgesetz (MEG) anwendet ergeben sich mit dem obigen Formalismus:

$$\text{(MWG)} \quad K_D = \frac{[Ak] \times [Ag]}{[AkAg]} \qquad (1)$$

$$\text{(MEG)} \quad [Ak_T] = [Ak] + [AgAk] \qquad (2)$$

Aus (1) und (2) folgt:

$$K_D \times [AgAk] = ([Ak_T] - [AgAk]) \times [Ag]$$

oder

$$\frac{[AgAk]}{[Ag]} = -\frac{1}{K_D} \times [AgAk] + \frac{[Ak_T]}{K_D}$$

(Mathematische Grundgleichung der Scatchard-Analyse)

AgAk = "Bound" = Antigen-Antikörperkomplex

Ag = "Free" = Antigen = Steroid = Ligand

Ak = Antikörper

K_D = Dissoziationskonstante

Ak_T = Ak bei Sättigung der Bindungsstellen

Aus den Titrationskurven kann man durch Transformation nach SCATCHARD[111] oder durch
Anwendung der MICHAELIS-MENTON-Gleichung[112] die Assoziationskonstante ermitteln.
Bei Anwendung der MICHAELIS-MENTON-Gleichung für bimolekulare Systeme im Gleichgewicht ist die Assoziationskonstante definiert als der Reziprokwert an freier Steroidkonzentration bei Halbsättigung der Antikörperbindungsstellen.
Als Ligand setzt man radioaktiv markiertes Steroid mit bekannter spezifischer Aktivität (Bq/mol) ein.
Man titriert nun eine konstante Menge an Antikörper mit steigenden Konzentrationen an radioaktiv markierten Liganden (Steroidhormon) und inkubiert über einen definierten Zeitraum von 16 Stunden bei 4° C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit trennt man antikörpergebundene von nicht gebundener freier Radioaktivität nach einer definierten Methode (Dextran-Aktivkohle).
Die molare Menge an freier und antikörpergebundener Aktivität wird für jede Konzentration berechnet. So erreicht man mit zunehmender Konzentration an Steroid eine Absättigung der Antikörperbindungsstellen.

Abb. 31 zeigt den graphischen Verlauf der Titration bei Transformation nach SCATCHARD am Beispiel der untersuchten Antikörper A 110 und A 112.

Diese lineare Transformation wird deshalb häufig gewählt, weil gesuchte Parameter graphisch oder rechnerisch mit Hilfe einer gewichteten linearen Regression ermittelt werden können.
Solch gewichtete lineare Regression ist Bestandteil einer Computer-Software, mit deren Hilfe an der Universitäts-Frauenklinik Hormonrezeptoren quantitativ ermittelt werden.

Die numerischen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. (Tabelle 1o)
Aus der Steigung der Geraden wird vom Rechner die Assoziationskonstante für die Antiseren direkt ermittelt.

Für Antiserum A 110 ist $K_A = 3.8 \times 10^9 \, L \times M^{-1}$.

Für Antiserum A 112 errechnet man

$$K_A = 3.4 \times 10^9 \, L \times M^{-1}.$$

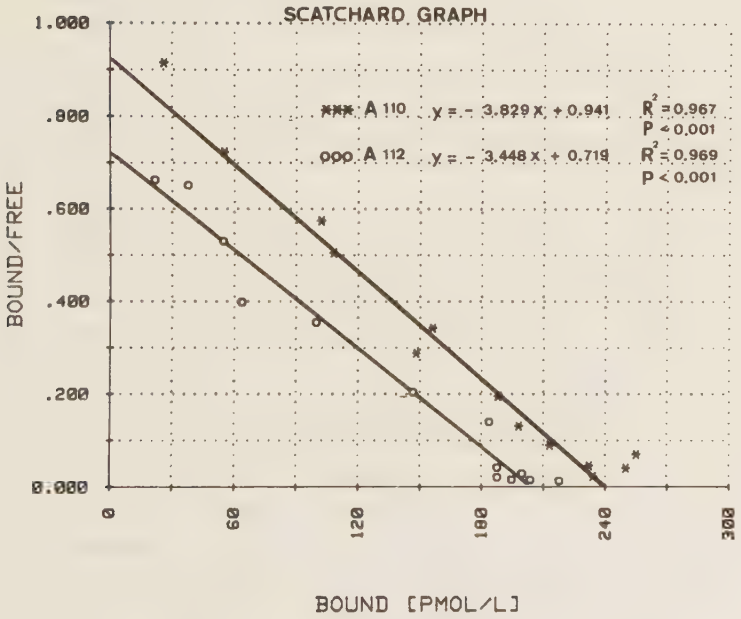


Abb. 3o: Graphische Darstellung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung durch Transformation nach SCATCHARD[111].

Tabelle 10: Numerische Daten für die Scatchard-Analyse der Antiseren A110 und A112

A110, Verdünnung 1:3600			A112, Verdünnung 1:3600		
Bound(B) (pmol)	Free(F) (pmol)	B / F	Bound(B) (pmol)	Free(F) (pmol)	B / F
26	28	0.9286	22	33	0.6667
55	77	0.7143	38	58	0.6552
102	176	0.5796	55	103	0.5339
108	215	0.5023	64	159	0.4025
156	457	0.3414	100	279	0.3584
148	514	0.2879	147	706	0.2082
188	968	0.1942	184	1277	0.1441
198	1516	0.1306	188	4087	0.0459
213	2396	0.0889	200	6061	0.0329
255	3656	0.0697	218	12832	0.0179
232	5147	0.0451	195	9832	0.0198
250	6283	0.0398	204	10564	0.0193
234	10173	0.0230	188	7513	0.0250

Daten der gewichteten Regression

$y = -0.0038x + 0.9407$ $\quad$ $y = -0.0034x + 0.719$

$R^2 = 0.967 \quad (p < 0.001)$ $\quad$ $R^2 = 0.969 \quad (p < 0.001)$

$K_A = 3.8 \times 10^9\ L \times M^{-1}$ $\quad$ $K_A = 3.4 \times 10^9\ L \times M^{-1}$

6.4.
Spezifität der Antiseren

Die Spezifität des Antiserums überprüft man durch Bestimmung der Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden von ähnlichem Molekülbau[115,116]. Zur Festlegung der Kreuzreaktivität gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Man inkubiert das entsprechende Steroid mit steigender Konzentration, zusammen mit einer konstanten Antiserumverdünnung und einer konstanten Menge an radioaktivem Antigen unter RIA-Bedingungen.

   In einer ersten Reaktionsreihe wird durch Titration mit kaltem Antigen (Steroid) diejenige Konzentration ermittelt, die notwendig ist, um 50% der Antikörperplätze zu besetzen.
   In einem Parallelansatz wird unter aequivalenten Bedingungen anstatt kaltem Antigen das auf Kreuzreaktion zu testende Steroid mit steigender Konzentration zugesetzt. Auch hier wird die Konzentration ermittelt, die notwendig ist um 50% der Antikörperplätze zu besetzen.
   Der Quotient dieser so ermittelten Massenzahlen ergibt nach Multiplikation mit 100 den Prozentwert an Kreuzreaktivität für das getestete Steroid an.
   In Abbildung 32 sind solche Bindungskurven anhand zahlreicher Steroide illustriert.
2. Die andere Methode[116] zur Beschreibung der Kreuzreaktivität benutzt nicht die Ratio der Massenzahlen bei einem festgelegten Prozentsatz an Antikörperbesetzung. sondern hier werden festgelegte Massenzahlen an kaltem Antigen und kreuzreagierendem Steroid verglichen. Aus dem Quotienten der entsprechenden Antikörperbesetzung wird dann die Kreuzreaktivität festgelegt. Sinnvollerweise setzt man als fixe Massenzahl die höchste Konzentration der RIA-Standardkurve fest. Sie ist im vorliegenden Fall 1 ng/ml.

Bei dieser Beschreibung erhält man Informationen über die Wechselwirkung anderer Steroide im Meßbereich des Systems.

Definitionsgemäß gilt für das System 1

$$CR_{50\%}\ (\%) = \frac{\text{pg Steroid S bei 50\% Bindung}}{\text{pg Steroid X bei 50\% Bindung}} \times 100$$

Für die zweite Methode errechnet sich der Prozentsatz der Kreuzreaktivität zu

$$CR_{1ng}\ (\%) = \frac{\text{\% Verdrängung bei 1 ng Steroid X}}{\text{\% Verdrängung bei 1 ng Steroid S}} \times 100$$

Das Resultat sind vollkommen unterschiedliche Spezifitätskriterien für denselben Antikörper wie am nachfolgenden Beispiel demonstriert wird. (Tabelle 11).

Tabelle 11: Kreuzreaktivität des Antiserums A110 berechnet nach ABRAHAM[112] (Methode1) und DE LAUZON[116] (Methode2)

Hormon	Kreuzreaktivität % Methode 1	Methode 2
5-Androsten-3ß,17ß-diol	100	100
5-Androstan-3ß,17ß-diol	33	73
5-Androsten-3ß,17ß-diol-7α-carboxy-ethylthioether	357	108
5-Androsten-3α,17ß-diol	0.1	4.6
5-Androsten-3ß,17α-diol	0.1	3.4
5-Androsten-3ß-ol-17-on	0.3	6.7
5α-Androstan-17ß-ol-3-on	0.1	2.9
4-Androsten-17ß-ol-3-on	0.1	0.9
4-Androsten-3,17-dion	8.5	0.5

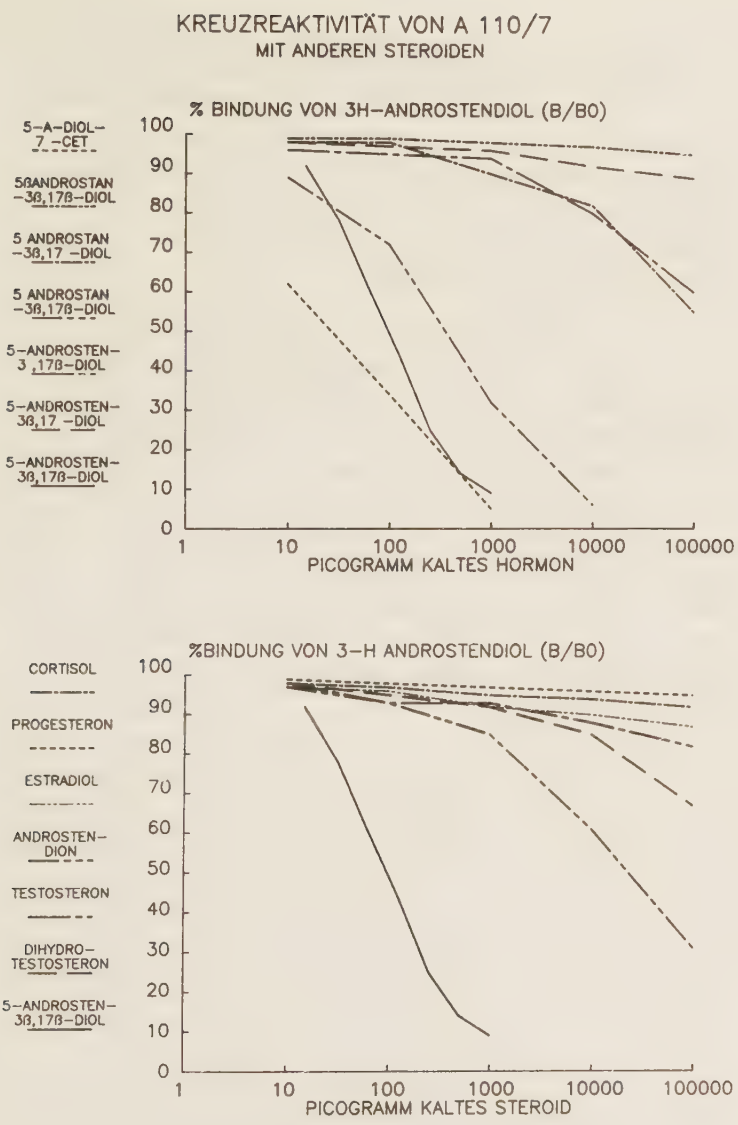


Abb. 32: Graphische Darstellung der Kreuzreaktivität von Antiserum A 11o/7 mit anderen Steroiden durch Feststellung der prozentualen Besetzung von Antikörperplätzen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an zu testendem Steroid unter RIA-Bedingungen.

In Tabelle 12 sind die Kreuzreaktionen der Antiseren mit anderen Steroiden zusammengefaßt. Die Kreuzreaktivität ist nach de Lauzon[116] ermittelt. Man erkennt, daß beide untersuchten Antiseren in der Lage sind, α-ständige Hydroxylgruppen im Androsten-Grundkörper sowohl in 3- als auch in 17-Stellung zu unterscheiden. Auch Ketonfunktionen an diesen Positionen werden erkannt. Desgleichen Substituenten an anderen Positionen im Steroidskelett.

Eine sehr hohe Kreuzreaktivität wird jedoch mit dem 5α-Androstan-3ß,17ß-diol festgestellt. Dieses Steroid unterscheidet sich vom Androstendiol lediglich durch die fehlende Doppelbindung zwischen C5 und C6. Ein Grund für die Unspezifität mag die Nachbarschaft des Spacermoleküls im verwendeten künstlichen Antigen sein. Möglicherweise maskiert das relativ voluminöse Schwefelatom über $d_{\pi} - p_{\pi}$-Wechselwirkungen molekulare Charakteristika der Steroiddeterminante in diesem Bereich. Diese These wird unterstützt durch die hohe Kreuzreaktivität der Antiseren mit der als Hapten eingesetzten Androstendiol-Thioäthercarbonsäure.

Tabelle 12: Kreuzreaktivität der Antiseren A110 und A112 mit anderen Steroiden nach DE LAUZON[116]

Hormon	Kreuzreaktivität % A110	A112
5-Androsten-3ß,17ß-diol	100	100
5-Androsten-3ß,17α-diol	3.4	5.2
5-Androsten-3α,17ß-diol	4.6	1.3
5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetet	1.1	0.8
5-Androsten-3ß,17ß-diol-17-acetat	2.8	0.8
5-Androsten-3ß-ol-17-on (Dehydroepiandrosteron)	6.7	3.7
5α-Androstan-3ß,17ß-diol	73	85
5α-Androstan-3ß,17α-diol	1.9	2.4
5α-Androstan-3α,17ß-diol	1.3	3.9
5ß-Androstan-3ß,17ß-diol	0.8	0.1
5α-Androstan-17ß-ol-3-on (Dihydrotestosteron)	2.9	7.7
4-Androsten-17ß-ol-3-on (Testosteron)	0.9	2.5
4-Androsten-3,17-dion (Androstendion)	8.5	15
5α-Androstan-3,17-dion	6.2	9.9
5ß-Androstan-3,17-dion	1.8	0.7
Pregn-4-en-3,20-dion (Progesteron)	>0.1	>0.1
17α-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion	>0.1	>0.1
5α-Pregnan-3,2o-dion (Dihydroprogesteron)	>0.1	>0.1
3ß-Hydroxy-5ß-pregnan-20-on	>0.1	>0.1
21-Hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (Deoxycorticosteron)	>0.1	>0.1
11ß,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (Corticosteron)	>0.1	>0.1
11ß,17α,21-Trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (Cortisol)	>0.1	>0.1
1,3,5(10)-Estratrien-3,17ß-diol (Estradiol)	>0.1	>0.1
5α-Androstan-3ß-ol-17-on (Epiandrosteron)	>0.1	>0.1
5-Androsten-3ß,17ß-diol-7α-carboxyethylthioether	108	127

7.
Radioimmunoassay von Androstendiol

Der Radioimmunoassay ist im Prinzip eine kompetitive Proteinbindungsanalyse. Dabei agiert der Antikörper im Vergleich zum Antigen im Unterschuß. Um diese begrenzte Zahl an Antikörperplätzen konkurrieren definierte Mengen an radioaktivem Antigen (Tracer, oder heißes Hormon).
Es ist leicht einzusehen, daß mit zunehmender Menge an zu bestimmendem Antigen in der Meßprobe die Bindungschancen der Tracermoleküle an der limitierenden Menge des Antikörpers sinken. Dieser Effekt wird bei Erstellung der Standardkurve sichtbar.

Wegen der Uneinheitlichkeit der verwendeten Antikörper und der daraus resultierenden Schwierigkeit bei der mathematischen Erfassung des Meßsystems, bedient man sich in der Praxis eines Eichsystems. Diese Standards, mit definierten Konzentrationen an Antigen, werden bei jeder Messung mitgeführt.

7.1.
Standards

Kleine Moleküle, wie Steroide, Pharmaka oder Schilddrüsenhormone sind in der Regel relativ stabil und damit gleichbleibend immunoreaktiv. Aus kristallinem Steroidhormon stellt man sich zunächst eine Maßlösung der Konzentration 100 mg in 100 ml Ethanol her.

Diese Urlösung wird mit Gelatinepuffer verdünnt bis zur höchsten Konzentration der RIA-Standards von 1000 pg/0,1 ml. Aus dieser Konzentration werden die restlichen Standards durch lineare Verdünnung mit demselben Gelatinepuffer präpariert.

Als Standardpunkte erhält man: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 und 15,7 pg pro 0,1 ml.

7.2.
Tracer

Als Tracer bezeichnet man das radioaktiv markierte Antigen. Es soll folgende Bedingungen erfüllen:

1. Kein immunologischer Unterschied zwischen Tracer und Antigen
2. Gut meßbare radioaktive Strahlung
3. Möglichst hohe spezifische Aktivität
4. Möglichst geringe Radiolyse

Die beste Möglichkeit ohne Veränderung der Immunreaktivität besteht in einer isotopen Markierung des Antigens. Bei Steroiden bieten sich Tritium oder Kohlenstoff 14 an.

Ideales Markerisotop sind ^{125}J markierte Antigene wegen der geringen Halbwertszeit und der sehr hohen spezifischen Aktivität dieses Gammastrahlers.
Erst in neuerer Zeit hat jedoch dieses Markierungsprodukt Einzug beim Radioimmunoassay von Steroiden gefunden[117,118].

Eine große Bedeutung als Tracer haben auch heute noch tritiierte Steroidhormone.
Im vorgestellten RIA wird kommerziell erhältliches 1,2-tritiiertes Androstendiol eingesetzt, dessen Reinheit dünnschichtchromatographisch gesichert ist.

Für den RIA stellt man sich aus der mit Ethanol verdünnten Urlösung für den jeweiligen Assay entsprechende Lösungen der Aktivität 20 000 dpm pro 0,1 ml in Gelatinepuffer her.

7.3.
Inkubation

Aus den kinetischen Untersuchungen ist ersichtlich, daß sich bereits nach 2 Stunden ein Gleichgewicht einstellt, wenn man bei 6° C inkubiert. (Abb.3o).
Aus technischen Gründen wird bei den nachfolgenden RIAs jedoch über Nacht (16 bis 20 Std.) inkubiert.

7.4.

Trennung von gebundenem und nicht antikörpergebundenem Antigen

Die Trennoperation ist ein entscheidendes Kriterium für die Qualität des Analysenergebnisses. Es stehen mehrere Methoden, wie Ausfällung des Antigen-Antikörperkomplexes, Einsatz eines zweiten Antikörpers oder Adsorption des freien Antigens mit geeignetem Adsorptionsmitteln zur Verfügung.

Letztere ist Methode der Wahl bei den Radioimmunoassays von Steroidhormonen wenn tritiierte Steroide als Tracer benutzt werden. Da es sich bei den Adsorbentien um oberflächenaktive Stoffe handelt, verringert man das Risiko der Gleichgewichtsstörung durch Arbeiten bei niedrigen Temperaturen. Zusätzlich behandelt man die als Adsorbens eingesetzte Aktivkohle vorher mit Dextran, um besonders aktive Zentren zu blockieren.
Im vorgestellten RIA wird die Aktivkohle mit Dextran T 70 behandelt.
Die Inkubationsmischung wird nach Zugabe der Aktivkohlesuspension 20 Minuten bei 4° C inkubiert[119] und danach zentrifugiert. Der Überstand wird direkt in den Scintillationscocktail gegossen.

7.5.

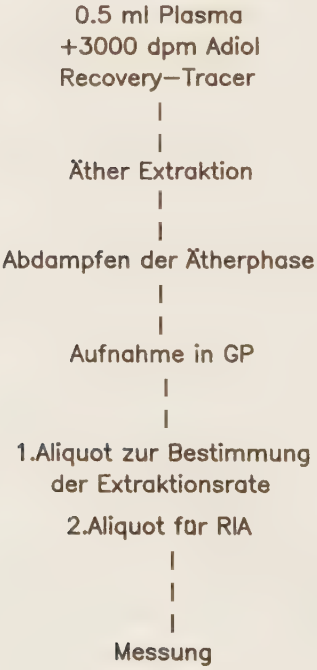
Durchführung des Radioimmunoassay

Die Durchführung des Radioimmunoassay ist schematisch im folgenden Fließdiagramm dargestellt. Eine direkte Bestimmung des Androstendiols im Plasma ist nicht möglich, weil dort eine Reihe von Proteinen existieren, welche als Transportproteine für die Steroide fungieren[120]. Diese Proteine würden durch unspezifische Assoziation Meßwerte unbekannter Proben verfälschen.
Man umgeht diesen Effekt, indem man vor dem eigentlichen Radioimmunoassay einen Extraktionsschritt durchführt, indem man mit einem geeigneten Extraktionsmittel die lipophilen Steroide aus dem wässrigen Plasmamilieu extrahiert.

Die Extraktionsrate für das Steroid ermittelt man quantitativ durch Zugabe von geringen Mengen an radioaktiv markiertem Steroid zur jeweiligen Plasmaprobe. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wird die Plasmaprobe extrahiert. Das organische Lösungsmittel entfernt man durch Abblasen mit Stickstoff. Der eingetrocknete Rückstand wird mit Gelatinepuffer aufgenommen, entsprechende Volumina für den Radioimmunoassay bereitgestellt und ein Teil zur Wiederfindung der extrahierten Radioaktivität verwendet.

Im vorgestellten RIA von Androstendiol werden 0.5 ml Plasma zur Extraktion eingesetzt. Dieses Volumen versetzt man mit 0.05 ml einer ethanolischen Lösung von radioaktiv markiertem Androstendiol mit geringer Aktivität (ca. 3000 dpm) und inkubiert eine Stunde. Anschließend extrahiert man mit 5 ml Diethyläther. Zur besseren Phasentrennung zentrifugiert man kurz in der Kühlzentrifuge. Die wässrige Phase wird nun durch Einfrieren bei -20° C im Reagenzglas fixiert. Danach entfernt man die organische Phase durch einfaches Abgießen.

FLUSSDIAGRAMM DES ANDROSTENDIOL–RIA



Die organische Phase wird mit Stickstoff zur Trockene eingedampft. Den Trockenextrakt nimmt man in 0.5 ml Gelatinepuffer auf. Für den RIA werden 0.1 ml als Doppelbestimmung pro Probe eingesetzt. Zur Wiederfindung werden 0.1 ml direkt in den Scintillationscocktail gegeben.

7.6. Auswertung

Wegen der Schwierigkeit zur mathematischen Beschreibung der Antigen-Antikörper-Reaktion beschränkt man sich heute auf die formale Erfassung von Meßpunkten der Standardkurve. Eine Variante ist die Logit-Log-Transformation nach RODBARD[121]. Bei dieser Approximation wird die Standardkurve als eine Gerade mit einem Nullübergang dargestellt. Über eine Regressionsanalyse lassen sich dann mathematische Form mit den tatsächlichen Meßwerten korrelieren.
Als mathematisches Modell gilt:

$$\text{Logit}\ \frac{B}{B0} = \log \frac{B/B0}{1-B/B0} = \log\ Ag$$

B = antikörpergebundener Anteil des Tracers nach Verdrängung durch die entsprechende Menge an eingesetztem Standard.

B0 = antikörpergebundener Anteil des Tracers ohne zusätzliches Antigen (Nullbindung).

Ag = Konzentration des zu bestimmenden Antigens.

In Abb. 33 ist eine RIA-Standardkurve nach Logit-Log-Transformation graphisch dargestellt. Diese Darstellung ist Bestandteil einer Computer-Software, mit welcher an der Universitäts-Frauenklinik sämtliche RIA-Standardkurven ausgewertet werden. Die beiden Pfeile markieren die Grenzen zwischen Logit 2.2 und - 2.2 . Konzentrationen, die außerhalb dieser Grenzen liegen, sind mit einem sehr großen mathematischen Fehler behaftet. Dieser Fehler resultiert aus der Zwangslinearisierung bei diesem Berechnungsverfahren. Durch Festlegung dieser Grenzen wird der Fehler, welcher aus der "Stauchung" der Standardkurve bei sehr niedrigen und sehr hohen Konzentrationen resultiert, auf ein sinnvolles Maß beschränkt.

Als statistische Parameter werden vom Computersystem die Geradengleichung mit L = -2.490x + 5.1310 und der Korrelationskoeffizient auf dem Standardkurvenplot angegeben.

Die Korrelation der errechneten Standardkurve mit den Meßwerten innerhalb der festgelegten Grenzen ist mit R^2 = 0.9984 ausreichend.
Der Quotient B0/T mit 41.49% entspricht der Nullbindung. Diese Bindung wird erreicht, wenn der Antikörper nur mit radioaktivem Antigen inkubiert wird.

B_n/T beschreibt die gebundene Aktivität im höchsten Standardpunkt der Kurve (bei 1000 pg).

L0 beschreibt die Konzentration, bei welchem der Nulldurchgang der errechneten Kurve liegt. Bei diesem Wert sind sind 50% der Antikörperplätze durch kaltes Antigen besetzt. Um diesen Meßbereich hat das System die größte Meßgenauigkeit.

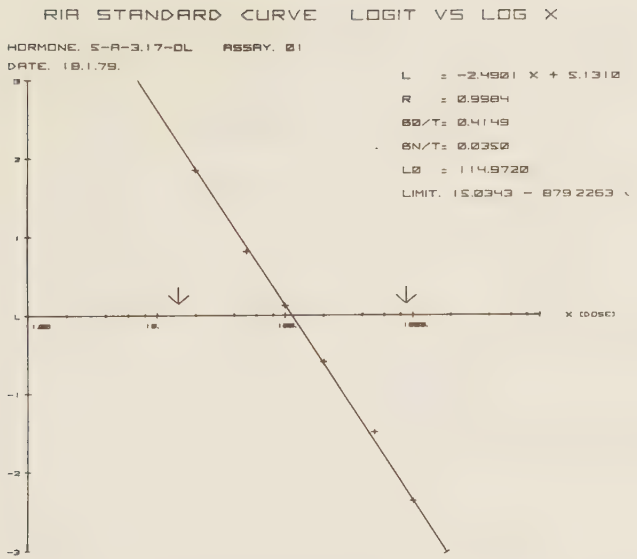


Abb. 33: RIA-Standardkurvenplot eines Androstendiol-Radioimmunoassays nach Logit-Log-Transformation.

7.7.
Qualitätskontrolle

7.7.1.
Präzision

Die statistische Streuung von Meßwerten um einen Mittelwert können als Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient charakterisiert werden. Beide statistischen Größen sind jedoch nicht konstant über den gesamten Meßbereich des Radioimmunoassay.
Abb. 34 zeigt die Abhängigkeit der Analysenergebnisse von der Konzentration am Beispiel der Q.C.-Poolseren. Die numerischen Daten sind in Tab. 13 abgebildet. Die größte Präzision wird bei niedrigen Antigenkonzentrationen erreicht. Die zunehmende Standardabweichung bei zunehmender Antigenkonzentration ist die Folge der abnehmenden Steilheit der Standardkurve. Dies bedeutet, daß je nach Steilheit der Standardkurve Meßfehler in unterschiedlichem Ausmaß auf das Analysenergebnis übertragen werden.

Ein Sonderfall der Präzision ist die Nachweisgrenze. Man bezeichnet sie auch als Empfindlichkeit (sensivity). Rein formal ist es die Konzentration, die außerhalb des 2s-Bereiches des Nullstandards liegt.
Die Empfindlichkeit ist jedoch von der reziproken Assoziationskonstanten und den Assaybedingungen abhängig. Im vorliegenden RIA wird sie bei Logit 2.2 festgelegt, was gleichbedeutend mit einer Konzentration von 15 pg ist. Die Festlegung erscheint sinnvoll aus einem weiteren Grund:
Bei Extraktionsassays ist u. a. die Messung eines "Blank"-Wertes zwingend. Diesen Blankwert ermittelt man, indem man das Puffersystem als Probe behandelt. Die Meßwerte dafür liegen in allen Assays bei Werten, die kleiner als 15 pg sind.

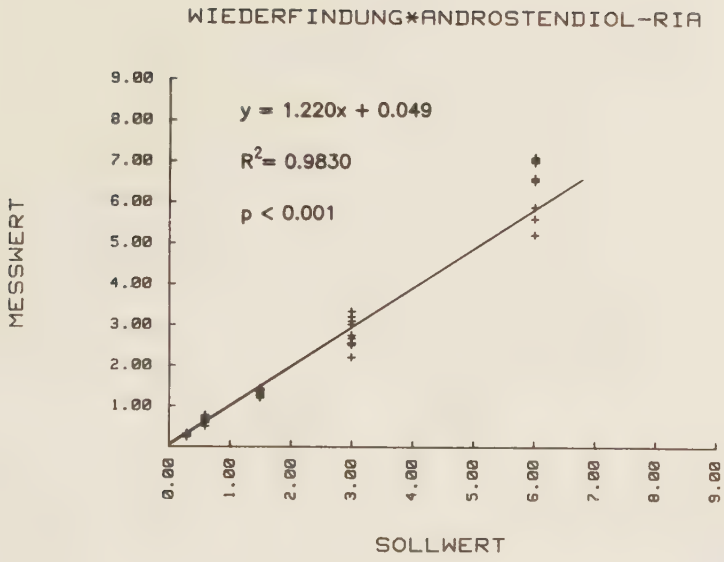


Abb.34: Richtigkeitskontrolle des Androstendiol-RIA durch Bestimmung der Wiederfindungsrate bekannter Androstendiolkonzentrationen. Die Punktwolken verdeutlichen Einzelmesswerte von 1o verschiedenen Assays.

Tabelle 13: Wiederfindung und Interassay-Präzision des Androstendiol-RIA

Sollwert (ng)	Messwert $\bar{X}$	Standard-abweichung	Variations-koeffizient	Wieder-findung	N
0.30	0.27	0.02	8.7 %	90 %	10
0.60	0.64	0.06	10.0 %	107 %	10
1.50	1.31	0.09	6.8 %	87 %	10
3.0	2.61	0.32	12.5 %	87 %	10
6.0	6.16	0.54	8.9 %	103 %	10

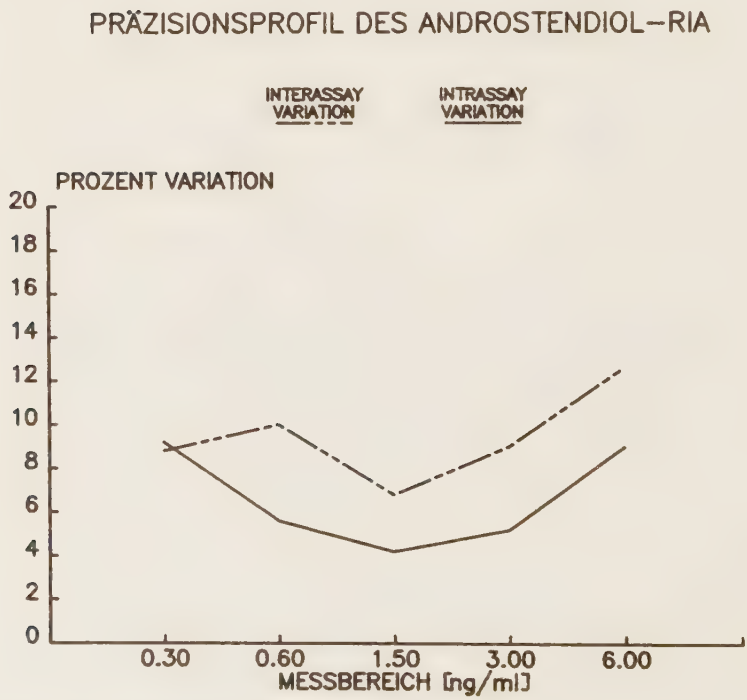


Abb.35: Graphische Darstellung der Interassay-(N=1o) und Intra-assay - Variation am Beispiel der Qualitätskontroll-Pool-seren.

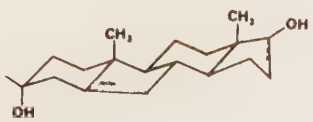
7.7.2.
Richtigkeit

Das zweite wichtige Qualitätskriterium eines Radioimmunoassays ist die Richtigkeit (accuracy). Sie gibt an, wie stark Meßergebnisse vom "wahren" Wert abweichen. Die Richtigkeitskontrolle für das vorliegende System wird durch Wiederfindungstests ermittelt. Dazu präpariert man einen Plasmapool mit steigenden Konzentrationen an Antigen. Die Wiederfindungsrate im vorliegenden System ist in Tab. 13 dargestellt. In einer Regressionsanalyse werden Meßwerte und Sollwerte miteinander verglichen. Die resultierende Gerade und der Korrelationskoeffizient sind in Abb. 34 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse lassen erkennen, daß der Test in der Lage ist, über den ganzen Bereich der Standardkurve unbekannte Konzentrationen mit ausreichender Richtigkeit zu detektieren.

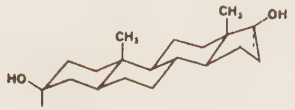
7.7.3
Spezifität des Androstendiolassays

Die Spezifität als weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal gibt an, wie stark das Ergebnis durch andere Steroidhormone gestört, bzw. nicht gestört wird. Ein Maß für solche Interferenzen ist die Kreuzreaktivität des Antiserums. Untersuchungen darüber sind bereits in Kapitel 6.4 diskutiert.

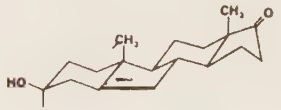
Mit Ausnahme des 5α-Androstandiols, welches mit über 80% Kreuzreaktivität die Bestimmung des Androstendiols beeinflußt, sind die störenden Einflüsse anderer Steroide vernachlässigbar.
Die extreme Kreuzreaktivität schließlich mit 5α-Androstandiol zwingt zur säulenchromatographischen Separierung dieses Hormons vor dem RIA.



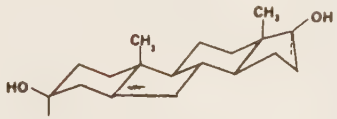
5 -Androsten-3 ,17ß-diol
(4.6%)



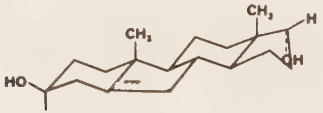
5 -Androstan-3ß,17ß-diol
(73%)



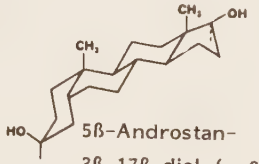
5-Androsten-3ß-ol-17-on
(6.7%)



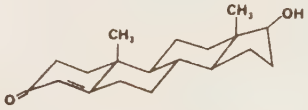
5-Androsten-3ß,17ß-diol
(100%)



5-Androsten-3ß,17 -diol
(3.4%)



5ß-Androstan-
3ß,17ß-diol (0.8%)



4-Androsten-17ß-ol-3-on
(0.9%)

Abb.36: Räumliche Darstellung einiger Vertreter aus der Androsten- bzw. Androstanreihe und deren prozentuale Kreuzreaktivität mit Antiserum A 110/7

8.
Experimenteller Teil

8.1.
Chemikalien

Folgende Chemikalien werden von der Firma EGA-Chemie, Steinheim geliefert:
N-Bromsuccinimid, Chlorameisensäureisobutylester, Carboxymethoxylamin hemihydrochlorid.

Von der Firma MERCK, Darmstadt werden folgende Chemikalien verwendet:
Azobisisobutyronitril, 3-Mercaptopropionsäure, Essigsäureanhydrid, Benzoylchlorid, Natriumborhydrid, 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat, n-Butyllithium (15%ig in n-Hexan), N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid sowie alle Lösungsmittel (p.A.) und weitere Grundchemikalien.

Kristallines Androstendiol und Dehydroepiandrosteron sind bei SIGMA-Chemie, München erhältlich.

Firma SERVA, Heidelberg liefert Norit A (Aktivkohle) und Gelatine reinst.

Dextran T 70 liefert PHARMACIA, Freiburg.

Freund's adjuvant complete und incomplete liefert DIFCO LABORATORIES, Detroit.

Rinderserumalbumin ist bei BEHRING, Marburg erhältlich.

Radioaktiv markiertes 5-Androsten-3ß,17ß-diol, - $[1,2\text{-}^3H\text{-}(N)]$ (52 Ci/mMol) und Dehydroepiandrosteron, $[1,2\text{-}^3H(N)]$ (55 Ci/mMol) liefert NEW ENGLAND NUCLEAR, Dreieich.

Die radioaktiven Betastrahler werden dünnschichtchromatographisch vierteljährlich auf Reinheit geprüft und bei Radiolyseanzeichen säulenchromatographisch gereinigt.

Dioxan, Tetrahydrofuran und Pyridin werden nach Destillation über KOH über eine Aluminiumoxidsäule geschickt.

Diethylether wird über Molekularsieb (4 Å) getrocknet und ebenfalls über eine Aluminiumoxidsäule gereinigt.
Ethanol wird über Magnesiumethylat absolutiert.
Tetrachlorkohlenstoff, Aceton und Äthylenglykol werden über $CaCl_2$ destilliert.
Eisessig wird über Phosphorpentoxid getrocknet und im Gefrierschrank aufbewahrt.

8.2.
Chromatographie

8.2.1.
Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionsansätze, Ausgangsverbindungen und synthetisierte Verbindungen werden dünnschichtchromatographisch charakterisiert. Man verwendet 10 x 20 cm DC-Fertigplatten des Typs 60 F_{254} der Firma MERCK, Darmstadt. Die durchschnittliche Laufstrecke beträgt 15 cm. Folgende Fließmittelsysteme finden Verwendung:

A: Chloroform
B: Cyclohexan: Ethylacetat 1:1
C: Benzol : Ethylacetat 2:1
D: Benzol : Ethylacetat:Ethanol 2:1:1

Die Detektion erfolgt entweder über UV-Fluoreszenzlöschung oder durch Besprühen der Platten mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz [126,127] und Entwicklung bei 110° C. Das Reagenz gibt für Δ 5-3-Sterole eine charakteristische Farbreaktion.

8.2.2.
Präparative Schichtchromatographie

Dafür werden Fertigplatten des Typs 60 F_{254} (20 x 20 cm, Schichtdicke 0.5 mm) der Firma MERCK verwendet.

8.2.3.
Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Auftrennung von Substanzgemischen erfolgt über SiO_2 (Kieselgel 60 F_{254}, Korngröße 0.063 - 0.2 mm) oder Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral der Aktivitätsstufe I (Korngröße 0.063 -0.2 mm). Aufgetrennte Fraktionen werden durch Tüpfelung dünnschichtchromatographisch ermittelt.

8.3.
Spektroskopische Methoden

8.3.1.
Kernresonanzspektroskopie

Für die Kernresonanzspektroskopie werden folgende Multikern-NMR-Spektrometer der Firma BRUKER, Karlsruhe eingesetzt:
Für die ^{1}H-NMR-Spektroskopie das HFX-90-Gerät bei 90 MHz bzw. das WM-400-Gerät bei 400 MHz. Für die Aufnahmen der protonenbreitbandentkoppelten und der "Off-resonance"-^{13}C-NMR-Spektren das WP-80-Gerät bei 20.115 MHz und für die ^{13}C-NMR-Spektren nach der Spin-Echo-Methode das WM-400-Gerät bei 100 MHz.

Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Für Off-resonance-Messungen wird die Entkopplerleistung auf 0.4 Watt eingestellt. Die Entkopplerfrequenz wird dabei um 500 Hz zu höheren Wellenlängen verschoben. Die Spreizung beträgt bei den ^{1}H-NMR-Spektren 20 Hz/cm, bei den ^{13}C-NMR-Spektren 125 Hz/cm.

Für die Aufnahme von ^{1}H-NMR-Spektren werden 5 mg der zu messenden Substanz in ca. 0.5 ml für die Aufnahme von ^{13}C-NMR-Spektren 80 -130 mg Substanz in ca. 1 ml des entsprechenden deuterierten Lösungsmittel gelöst. Die angegebenen δ -Werte in ppm beziehen sich auf $\delta_{TMS} = 0.0$ ppm.

8.3.2.
Massenspektrometrie

Die Elektronenstoß-Massenspektren (MS) werden mit dem Gerät MAT 711 der Firma VARIAN, Bremen, mit direktem Einlaßsystem gemessen. Die Elektronenenergie beträgt 70 eV, die Ionenquelle-Temperatur 200° C. Als Lösungsmittel für die Steroidderivate eignen sich $CHCl_3$ und CH_2Cl_2.

8.3.3.
Infrarot-Spektroskopie

Zur Aufnahme der IR-Spektren werden KBr-Preßlinge hergestellt, die 1.5 mg Substanz pro 300 mg KBr enthalten. Die Spektren werden mit den Spektrographen 2021 und 021 der Firma PERKIN-ELMER, Überlingen, gemessen.

8.3.4.
Drehwerte

Die Drehwerte werden im Perkin-Elmer-Polarimeter 241 in der 10 cm Küvette (ca. 5 ml Volumen) oder in der 1cm Küvette (ca. 0.5 ml Volumen) bei der Natrium-D-Linie (589 nm) gemessen. Die Temperatur der Küvetten wird während der Messung mittels eines Thermostaten auf + 20° C gehalten. Alle Messungen werden bei c = 1 (10 mg Substanz/ml) durchgeführt.

8.4.
Sonstige Methoden

8.4.1.
Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte werden mit dem Schmelzpunktbestimmungs-Apparat nach Dr. TOTTOLI, der Firma BÜCHI, Flawil, Schweiz, bestimmt. Wegen der Zersetzlichkeit der untersuchten Steroidderivate bei höherer Temperatur wird das Schmelzpunktröhrchen erst etwa 50° C unterhalb der erwarteten Schmelztemperatur in das Silikonöl eingetaucht.

8.4.2.
pH-Messungen

pH-Messungen werden im pH-Meter E 512 mit einer Einstab-Glaselektrode EA 120 der Firma METROM, Herisau, Schweiz, durchgeführt.

8.4.3.
Dialyse

Die Dialyse der Steroidcarbonsäure-Rinderserumalbumin-Konjugate wird in einer Ultrafiltrationszelle mit integriertem Magnetrührer der Firma AMICON, Witten, durchgeführt.

8.4.4.
Gefriertrocknung

Die salzfreien Konjugate werden in der Apparatur der Firma CENCO VIRTIS, Stockholm, gefriergetrocknet.

8.4.5.
Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitätsmessungen werden in einem Betacounter Isocap 300 der Firma SEARLE, New York, durchgeführt.

8.4.6.
Radiochromatographische Untersuchungen

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der verwendeten tritiierten Steroide auf Radiolyse werden mit einem Dünnschicht-Scanner LB 2723 der Firma BERTHOLD, Wildbad, durchgeführt.

8.4.7.
RIA-Auswertung

Die RIA-Auswertung wird im "Off-line" Betrieb mit einem speziell entwickeltem Software- Paket auf einem HP 9835 der Firma HEWLETT-PACKARD, Böblingen, durchgeführt.

8.5.
Arbeitsvorschriften

Sämtliche Reaktionen werden in einer Dreiring-Argonatmosphäre durchgeführt.

8.5.1.
5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-acetat (II)

Man löst 8.7 g (0.03 Mol) Androstendiol in 70 ml frisch destilliertem, trockenem Pyridin. Die Lösung wird vorsichtig mit 80 ml (o.06 Mol) Essigsäureanhydrid versetzt.
Man rührt 18 Stunden bei Raumtemperatur.

Danach wird das Lösungsmittel bei 30° C im Argonstrom abgeblasen. Der Rückstand wird in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 20 ml 10%iger Salzsäure gewaschen, um restliches Pyridin zu entfernen.
Man trocknet über Natriumsulfat und zieht das Ethylacetat am Rotationsverdampfer ab.
Der Rückstand wird säulenchromatographisch über SiO_2 gereinigt (System B).
Man kristallisiert in Äther/Methanol.
Ausbeute: 6.2 g (55 %)
Schmelzpunkt: 161° C

Rf_B : 0.70 (Androstendiol: Rf_B : 0.30)
$[\alpha]_D^{20}$: - 62° (C = 1, CH_2Cl_2)
$C_{23}H_{34}O_4$ (374.46) Ber.: C: 73.77 %, H: 9.15 %
Gef.: C: 73.65 %, H: 9.03 %

8.5.2.
3ß-Acetoxy-5-androsten-17-on (IV)

Man löst 8.6 g (0.03 Mol) Dehydroepiandrosteron in 70 ml trockenem Pyridin und gibt unter Rühren 40 ml (0.035 Mol) Essigsäureanhydrid hinzu. Die Mischung läßt man 18 Stunden (über Nacht) bei Raumtemperatur stehen. Danach wird das Pyridin mit Argon abgeblasen, der Rückstand mit Äther aufgenommen und einmal mit 10%iger Salzsäure gewaschen.

Man trocknet über Na_2SO_4 und zieht den Äther am Rotationsverdampfer ab. Die Verbindung wird säulenchromatographisch über SiO_2 aus dem Rückstand isoliert.
Man kristallisiert aus Äther/Methanol.
Ausbeute: 4.6 g (62 %)
Schmelzpunkt: 170° C

Rf_C : 0.65 (DHEA: 0.28)

$[\alpha]_D^{20}$: - 3° (C = 1, CH_2Cl_2)

$C_{21}H_{30}O_3$ (330.42) Ber.: C: 76.33 %, H: 9.15 %
Gef.: C: 76.16 %, H: 9.27 %

8.5.3.
5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat (V)

Man löst 0.19 g (0.005 Mol) $NaBH_4$ in 25 ml 95% Ethanol und kühlt im Eisbad ab. Unter Rühren tropft man in diese Mischung 1.6 g (IV) (0.005 M) gelöst in 20 ml 95% Ethanol.
Man rührt 3 Stunden bei 4° C.
Nicht umgesetztes Natriumboranat zersetzt man durch vorsichtiges Zutropfen von Eisessig.
Das Ethanol wird im Argonstrom abgeblasen und der Rückstand mit 200 ml Wasser verdünnt.

Man extrahiert mit Ethylacetat und trocknet über Natriumsulfat. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein gelbliches Öl, aus welchem das Reaktionsprodukt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert wird (System C).
Man kristallisiert aus Äther/Methanol.
Ausbeute: 0.58 g (35%)
Schmelzpunkt: 147° C

Rf_C : 0.35

$[\alpha]_D^{20}$: - 67° (C = 1, CH_2Cl_2)

$C_{21}H_{32}O_3$ (332.44) Ber.: C: 75.87 %, H: 9.70 %
Gef.: C: 75.63 %, H: 9.78 %

8.5.4.
5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VI)

Man löst 3.3 g (0.01 Mol) (V) in 20 ml absolutem Pyridin und kühlt die Mischung im Eisbad ab. Unter Feuchtigkeitsausschluß werden 12 ml (0.1 Mol) kaltes Benzoylchlorid unter Rühren zugetropft.
Man läßt die Reaktionsmischung über Nacht im Kühlschrank stehen. Anschließend bläst man überschüssiges Pyridin im Argonstrom ab. Der Rückstand wird mit Diäthyläther aufgenommen und

1. mit 10% HCL gewaschen
2. mit Wasser gewaschen
3. mit 5% $NaHCO_3$ nachgewaschen.

Die Ätherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet.

Man isoliert die Verbindung säulenchromatographisch über SiO_2 (System B), und kristallisiert aus Diäthyläther.

Ausbeute: 1.5 g (37%)
Schmelzpunkt: 175° C

Rf_B : 0.76

$[\alpha]_D^{20}$: - 1° (C = 1, CH_2Cl_2)

$C_{28}H_{36}O_4$ (436.52) Ber.: C: 77.04 %, H: 8.31 %
Gef.: C: 77.05 %, H: 8.26 %

8.5.5.
7-α-Brom-5-Androsten-3ß,17ß-diol-3-acetat-17-benzoat (VII)

Man löst 2.2 g (0.005 Mol) VI in 50 ml frisch destilliertem Tetrachlorkohlenstoff und erhitzt zum Sieden. Dazu gibt man in einer Portion die trockene Mischung aus 0.9 g N-Bromsuccinimid (0.005 Mol) und 50 mg Azobisisobutyronitril und kocht weitere 10 Minuten am Rückfluß.
Danach kühlt man die Reaktionsmischung in Kühlschrank ab und filtriert das ausgefallene Succinimid weg.
Anschließend zieht man den Tetrachlorkohlenstoff am Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird mehrmals in Ethylacetat aufgenommen und das Lösungsmittel anschließend wieder abgezogen.
Schließlich kristallisiert man den ölig, kristallinen Rückstand aus Ethanol/Äther (95:5).

Ausbeute: 1.1 g (45%)
Schmelzpunkt: 148° C (Lit.[32]: 131° C)

$[\alpha]_D^{20}$: -176° (C = 1, CH_2Cl_2) (Lit.[32] -193.5)

$C_{28}H_{35}O_4Br$ (516.51) Ber.: C: 65.11 %, H: 7.03 %, Br: 15.48 %
Gef.: C: 65.28 %, H: 7.21 %, Br: 15.64 %

8.5.6.

7-α Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol (VIII)

Man löst 2 ml 3-Mercaptopropionsäure (0.002 Mol) in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran und kühlt die Mischung im Kryostaten auf 0° C ab. Zu dieser Mischung tropft man vorsichtig 2.5 ml n-Butyllithium (0.004 Mol) hinzu und rührt 5 Minuten.
Die Metallierung äußert sich durch spontane Bildung eines weißen Niederschlags.
Die Reaktionsmischung wird nun mit 0.26 g (0.005 Mol) Bromderivat (VII), gelöst in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran, tropfenweise versetzt. Danach rührt man 20 Minuten in der Kälte weiter. Schließlich wird das THF mit Argon abgeblasen und der Rückstand vorsichtig zuerst mit Wasser, dann mit 10 ml 10% Salzsäure versetzt.
Man extrahiert mit 2x50 ml Ethylacetat und trocknet über Natriumsulfat. Nach Filtration wird das Ethylacetat abgezogen. Der Rückstand wird mit 30 ml 0.5%iger methanolischer Kalilauge versetzt, kurz gerührt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann bläst man das Methanol ab und versetzt mit 20 ml Wasser.
Diese Lösung wird nun vorsichtig mit 10% HCl auf pH 4.5 angesäuert.
Aus dieser Mischung wird die Säurekomponente mit Ethylacetat extrahiert.

Nach Trocknung über Natriumsulfat und Filtration wird das Lösungsmittel abrotiert.
Man filtriert den Rückstand über eine trockene Aluminiumoxidsäule. Als Elutionsmittel wird Methanol verwendet.
Die gereinigte Fraktion wird aus Äther/Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 40 mg (20%)
Schmelzpunkt: 228 - 230° C

Rf_D : 0.42

$[\alpha]_D^{20}$: -115° (C = 1, Dioxan)

$C_{22}H_{34}O_4S$ (394.51) Ber.: C: 66.97 %, H: 8.69 %, S: 8.13 %
Gef.: C: 66.98 %, H: 8.75 %, S: 8.26 %

8.5.7.
3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-a ndrosten (X)

In einer Eintopfreaktion werden 0.4 g p-Toluolsulfonsäure (0.002 Mol), 8.6 g (0.03 Mol) IV und 40 ml (0.7 Mol) Ethylenglykol unter azeotropen Bedingungen in 400 ml Benzol am Rückfluß gekocht. Zwischen Reaktionskolben und Rückflußkühler wird ein Soxhlet -Aufsatz(200 ml) installiert.
Die Soxhlet -Hülse wird zur Hälfte mit wasserfreiem Kalziumsulfat gefüllt.
Man kocht 24 Stunden am Rückfluß.
Nach dem Abkühlen wird die Reaktionsmischung mit gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert.
Die wässrige Phase extrahiert man zweimal mit Benzol, und trocknet anschließend die vereinigten organischen Phasen mit Kalziumsulfat.

Nach Abdampfen des Benzols wird der Rückstand säulenchromatographisch über SiO_2 separiert.
Man kristallisiert aus Äther/Methanol.

Ausbeute: 9.1 g (42%)
Schmelzpunkt: 145° C (Lit.[89] 142° C)

Rf_A : 0.78

$[\alpha]_D^{20}$: -177° (C = 1, CH_2Cl_2)

$C_{23}H_{34}O_4$ (374.46) Ber.: C: 73.77 %, H: 9.15 %
Gef.: C: 73.60 %, H: 9.20 %

8.5.8.
3ß-Acetoxy-17-ethylendioxy-5-androsten-7-on (XI)

Man löst 5.6 g (0.015 Mol) Verbindung X unter wasserfreien Bedingungen in 20 ml Eisessig und versetzt unter Rühren mit 10 ml Essigsäureanhydrid. Unter Rühren wird die Mischung bei Raumtemperatur mit wasserfreiem Natriumchromat und 20 Stunden bei 40° C gerührt. Danach gießt man die Mischung vorsichtig in eine gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung. Dabei fällt das Monoketosteroid aus und kann abfiltriert werden. Man wäscht zweimal mit Wasser, löst den Rückstand in Ethylacetat und trocknet über Natriumsulfat. Man isoliert das Monoketon säulenchromatographisch über SiO_2 (System C).
Das 7-Ketosteroid kristallisiert aus Methanol/Aceton in Form plättchenförmiger, leicht gelblicher Kristalle.

Ausbeute: 0.92 g (16%)
Schmelzpunkt: 185° C (Lit.[89] 175° C)

Rf_C : 0.62

$[\alpha]_D^{20}$: -423° (C = 1, CH_2Cl_2) (Lit.[89] -576°, C = 0.6, LM?)

$C_{23}H_{32}O_5$ (388.49) Ber.: C: 71.10 %, H: 8.30 %)
Gef.: C: 71.05 %, H: 8.34 %)

8.5.9.
3ß-Hydroxy-7-(O-carboxymethyl)-oximino-5-androsten-17-on (XII)

Man löst 0.78 g (0.002 Mol) des Ketons (XI) in 20 ml absolutem Pyridin und fügt 0.85 g (0.004 Mol) Carboxymethoxylaminhemihydrochlorid hinzu. Die Mischung wird 30 Stunden bei 45° C gerührt. Danach bläst man das Pyridin mit Argon ab. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und zuerst mit 0.1 n Salzsäure, dann mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Der Äther wird abgedampft. Den Rückstand nimmt man in 50 ml Aceton auf, fügt eine Lösung aus 0.25 g p-Toluolsulfonsäure in 5 ml Wasser hinzu und läßt 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen.
Danach bläst man das Aceton mit Argon ab. Der Rückstand wird vorsichtig mit 30 ml 1%iger methanolischer KOH versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wird das Methanol mit Argon abgeblasen und der Rückstand mit 50 ml Wasser verdünnt. Die wässrige, alkalische Phase wird mit dreimal 50 ml Äther extrahiert, dann säuert man mit 10% HCL vorsichtig bis auf pH 4 an. Die freigesetzte Säure wird mit Ethylacetat extrahiert und über eine 30 cm Al_2O_3-Säule chromatographiert.

Man eluiert über einen Äther/Methanol Gradienten.
Das Oxim kristallisiert aus Ethanol in Form farbloser Kristalle.

Ausbeute: 160 mg (22%)
Schmelzpunkt: 228°C (Lit.[89]: 228-230° C)

Rf_D : 0.20

$[\alpha]_D^{20}$: -225° (C = 1, Dioxan) (Lit.[89] -286, C = 0.6, LM?)

$C_{21}H_{29}O_5N$ (375.46) Ber.: C: 67.17 %, H: 7.78 %, N: 3.72 %
Gef.: C: 67.03 %, H: 7.84 %, N: 3.68 %

8.5.10.
3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion (XIII)

Aus der Ätherfraktion bei der säulenchromatographischen Reinigung des Oxims isoliert man nach Kristallisation in Aceton/Methanol leicht gelbliche Kristalle, welche elementaranalytisch keinen Stickstoff enthalten.
Aus 0.78 g Ausgangsverbindung XI erhält man 0.28 g der Verbindung XIII.

Schmelzpunkt: 237° C

Rf_C : 0.43

$[\alpha]_D^{20}$: -184° (C = 1, CH_2Cl_2)

$C_{19}H_{26}O_3$ (302.4) Ber.: C: 75.46 %, H: 8,67 %)
Gef.: C: 75.56 %, H: 8.60 %)

8.5.11.

7α-Carboxyethylmercapto-5-androsten-3ß,17ß-diol-Rinderserumalbumin nach der "mixed anhydrid"-Methode

0.1 mMol Thioäthercarbonsäure werden in 1 ml absolutem Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 0.07 ml (0.3 mMol) Tri-n-butylamin. Nach Abkühlen im Eisbad wird diese Mischung mit 0.04 ml (0.3 mMol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt und 30 Minuten gerührt.
In einem zweiten Reaktionsansatz werden 105 mg (0.0015 mMol) Rinderserumalbumin in 3 ml Wasser gelöst. Dazu gibt man 2 ml Dioxan. Mit 0.1 n NaOH stellt man die Lösung auf pH 8.5 ein und kühlt im Eisbad auf 0° C ab.
Zu dieser Lösung wird das im ersten Reaktionsansatz präparierte "mixed anhydride" der Thioäthercarbonsäure hinzugegeben. Man hält den pH-Wert während der folgenden drei Stunden durch Addition von 0.1 n NaOH zwischen 8.2 und 8.5 und rührt weitere 4 Stunden in der Kälte. Anschließend dialysiert man den Reaktionsansatz mit 30 Litern vollentsalztem Wasser.
Das Dialysat wird mit der 4-fachen Menge Aceton präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10 000 g sedimentiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat durch Ansäuern auf pH 5 solubilisiert und dann gefriergetrocknet.

Ausbeute: 86 mg Konjugat (82%)
Das Konjugat enthält durchschnittlich 19 Mol Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin.

8.5.12.
3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion-7-O-(carboxymethyl)oxim-Rinderserumalbumin nach der Carbodiimid-Methode

100 mg (0.27 mMol) Dehydroepiandrosteron-carboxymethoxylamin werden in 10 ml DMF gelöst. Diese Reaktionsmischung gibt man zu einer Lösung von 100 mg (0.52 mMol) 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid in 5 ml Wasser. Man rührt 30 Minuten bei Raumtemperatur und versetzt anschließend mit einer Lösung 150 mg (0.0021 mMol) Rinderserumalbumin in 15 ml 0.02 n Phospat-Mischpuffer(pH 7.2).

Der Reaktionsansatz wird 50 Stunden bei 6° C gerührt und anschließend 24 Stunden gegen 5 Liter 0.05 m Natriumhydrogencarbonat dialysiert.
Darauf folgt eine Dialyse mit 30 Litern voll entsalztem Wasser bei 6° C. Das Dialysat wird mit der 4-fachen Menge Aceton präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10 000 g konzentriert. Der Überstand wird verworfen, das Präzipitat nach Resuspension in Wasser durch Alkalisierung auf pH 7.5 solubilisiert. Anschließend wird gefriergetrocknet.

Ausbeute: 154 mg
Das Konjugat enthält durchschnittlich etwa 6 Mol Steroidkomponente pro Mol Rinderserumalbumin.

8.5.13.
Steroid Assay Puffer

a) 17.4 g Na_2HPO_4 (0.14 Mol)

b) 10.8 g NaH_2PO_4 (0.07 Mol)

c) 1 g NaN_3 (0.65 Mol)

d) 18 g NaCl (0.31 Mol)

e) 2 g Gelatine

Man erwärmt 1 Liter bidestilliertes Wasser auf 50° C, fügt zuerst 2 g Gelatine, dann 1 g NaN_3 hinzu und rührt bis sich die Gelatine aufgelöst hat. Anschließend wird das restliche Material hinzugefügt und die Lösung mit Wasser auf 2 Liter aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung beträgt 7.0.

8.5.14.
Aktivkohlesuspension

a) 625 mg Norit A

b) 62.5 mg Dextran T 70

c) 100 ml Assay Puffer

Die Suspension wird 15 Minuten gerührt. Sie ist bei 4° C für einen Monat stabil.

8.5.15.
Arbeitsstandards

Pool 1: 100 mg kristall. Steroid in 100 ml absolutem Ethanol (1 mg/ml)

Pool 2: 0.1 ml Pool 1 in 100 ml absolutem Ethanol (1µg/ml)

Pool 3: 0.1 ml Pool 2 in 10 ml Assay Puffer (1000 pg/0.1 ml)

Pool 4: 0.5 ml Pool 3 in 0.5 ml Assay Puffer (500 pg/0.1 ml)

Pool 5: 0.5 ml Pool 4 in 0.5 ml Assay Puffer (250 pg/0.1 ml)

Pool 6: 0.5 ml Pool 5 in 0.5 ml Assay Puffer (125 pg/0.1 ml)

Pool 7: 0.5 ml Pool 6 in 0.5 ml Assay Puffer (62.5 pg/0.1 ml)

Pool 8: 0.5 ml Pool 7 in 0.5 ml Assay Puffer (31.3 pg/0.1 ml)

Pool 9: 0.5 ml Pool 8 in 0.5 ml Assay Puffer (15.7 pg/0.1 ml)

Pool 3 ist bei 4° C einen Monat stabil.
Die Pools 4 - 9 werden vor jedem Assay neu verdünnt.

8.5.16.
Tritiierte Steroidhormon Arbeitslösung (Tracer)

Die Originallösung, bzw. chromatographisch gereinigter UR-Tracer wird in Ethanol auf eine Aktivität von etwa 200 000 dpm/0.01 ml verdünnt.
Vor jedem Assay wird mit Assaypuffer 1 : 100 verdünnt auf eine Aktivität von 20 000 dpm/0.1 ml (= 10 000 cpm bei 50% "counter efficiency").

8.5.17.
Radioaktive ^{3}H-Wiederfindungslösung

Aus der ^{3}H-Arbeitslösung stellt man durch Verdünnung mit Assaypuffer eine Lösung der Aktivität 2000 dpm/0.05 ml her. Dieses Volumen setzt man vor der Extraktion jeder Probe zu.

8.5.18
Herstellung von steroidfreiem Plasma

Zur Absorption der endogenen Steroide werden 5oo ml Plasma aus einer Blutkonserve mit 5 g Aktivkohle (Norit A) versetzt. Man rührt 1h bei 4°C und zentrifugiert die Suspension anschließend 1h lang bei 2o ooo g.
Der Überstand wird zur Herstellung der Qualitätskontrollplasmen verwendet.

8.5.19
Herstellung der Qualitätskontrollplasmen

Dazu wird Pool 2 (1ooo ng/ml) mit Ethanol 1:1o verdünnt. Man erhält eine Lösung mit 1o ng/o.1 ml.(Pool 1o).
Zur Herstellung des Q.C.-Pools (6 ng/ml) werden o.6 ml Pool 1o in ein 2o ml Glasgefäß pipettiert.
Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom abgedampft.
Anschließend versetzt man mit 1o ml steroidfreiem Plasma und schüttelt 1h. Die Mischung wird in o.5ml-Portionen eingefroren.

Entsprechend werden die restlichen Kontrollplasmen durch Aliquots aus Pool 1o hergestellt.

9.

Zusammenfassung

Verknüpft man Steroide kovalent mit makromolekularen Trägern und setzt diese Halbantigene oder "Haptene" zur aktiven Immunisierung tierischer Organismen ein, so können Antikörper gegen die Steroiddeterminante generiert werden. So gewonnene Antikörper können erfolgreich für den Radioimmunoassay (RIA) von Steroiden in biologischen Flüssigkeiten eingesetzt werden.
Benutzt man substanzspezifische funktionelle Gruppen des A- oder D-Ringes als Verknüpfungspunkte zwischen Steroid und makromolekularem Träger erhält man relativ unspezifische Antikörper mit beträchtlicher Kreuzreaktion zu strukturähnlichen Steroiden. Deshalb wird versucht, solche Positionen des Steroidkerns zu aktivieren, an welchen keine hormonspezifischen funktionellen Gruppen sitzen.
Als Abstandhalter zwischen Proteinträger und Steroid dienen zweizähnige "Spacermoleküle" , wie Dicarbonsäuren oder Thiocarbonsäuren mit Kettenlängen zwischen 1 und 4 Kohlenstoffatomen.
Die besten Antikörper gegen das entsprechende Steroid erhält man, wenn sämtliche steroidspezifischen, funktionellen Gruppen als freie, zusätzliche Determinanten im Hapten wirken können. Dies erreicht man durch entsprechende sterisch günstige Verankerung über ein entsprechendes Spacermolekül. Diese Punkte sind die Basis für die Synthese zweier Steroidhaptene deren Synthese im ersten Teil der Arbeit beschrieben werden.
Durch aktive Immunisierung mit den synthetisierten Antigenen werden im Tierorganismus Antikörper erzeugt, welche nach Titer, Affinität und Spezifität charakterisiert werden.
Schließlich wird mit diesen Antiseren ein Radioimmunoassay entwickelt, mit welchem Androstendiol ab einer Konzentration von 20 pg quantitativ bestimmt werden kann.

Die Synthese der künstlichen Antigene

Als Ankerpunkt für die Verknüpfung von Steroid mit Protein soll Kohlenstoffatom 7 im Androstenmolekül fungieren.
Die Funktionalisierung dieser Position erreicht man durch Einführung eines Bromsubstituenten.
Die selektive Bromierung der Allylstellung erfolgt nach Wohl-Ziegler mit N-Bromsuccinimid. Dazu ist es notwendig, die sekundären Hydroxylfunktionen des Androstendiols über eine Veresterung zu schützen.
Vom 3-acetylierten, 17-benzoylierten Androstendiol kann ein stabiles Bromisomer isoliert und physikalisch charakterisiert werden. Vom Diacetat des Androstendiols läßt sich kein stabiles Bromderivat isolieren.
Für die Synthese von 5-Androstendiol-3-acetat-17-benzoat geht man vom Dehydroepiandrosteron aus. Dessen Hydroxylfunktion in 3-Stellung wird in üblicher Weise mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Anschließend reduziert man die 17-Ketofunktion mit Natriumboranat.
Als Hauptprodukt bei dieser Umsetzung entsteht das 17ß-Hydroxyderivat.
Die Konformation läßt sich NMR-spektroskopisch durch Vergleich der entsprechenden Signale mit denen des Androstendiols absichern .

Die 17ß-Hydroxygruppe setzt man schließlich nach der Einhorn-Variante der Schotten-Baumann-Reaktion durch Alkoholyse mit Benzoylchlorid und Pyridin als säurebindendem Medium zum Benzoat um.
Die anschließende Bromierung mit NBs erfolgt thermisch.
Die sterische Anordnung des Bromsubstituenten wird offensichtlich von den Reaktionsbedingungen und der Art der nachfolgenden Kristallisation entscheidend beeinflußt.
Unter den in dieser Arbeit beschriebenen thermische Bedingungen, anschließender vollständiger Entfernung des Lösungsmittels Tetrachlorkohlenstoff mit Essigsäureäthylester als Schlepper und

fraktionierter Kristallistation in einem Äther/Ethanol-Gradienten erhält man das thermodynamisch stabilere α-Bromderivat.

Die α-Substitution läßt sich aus den NMR spektroskopischen Daten interpretieren.
So findet man im ^{1}H-NMR als Signal für das vinylische Proton ein Dublett. Diese Aufspaltung ist Folge einer Kopplung mit dem C7-Proton, welches aus sterischen Gründen nur aus ß-Stellung mit dem vinylischen Proton koppeln kann.

Bei zahlreichen Haptensynthesen wird Mercaptopropionsäure als zweizähniges Spacermolekül verwendet. Die Umsetzung mit halogensubstituierten Steroiden erfolgt dort unter basisch protischen Bedingungen.
Analoge Reaktionsbedingungen führen jedoch bei der Umsetzung des Androstendiolderivates nicht zur gewünschten Thioäthercarbonsäure.

Erstmalig wird im Rahmen dieser Arbeit eine neue Variante der Kopplung von Mercaptopropionsäure mit halogensubstituierten Steroiden beschrieben. Und zwar wird die Mercaptopropionsäure zunächst durch Metallierung mit n-Butyllithium aktiviert und anschließend in einer Eintopfreaktion mit dem bromsubstituierten Steroid umgesetzt.
Im Sinne einer S_N1-Reaktion bildet sich dabei die entsprechende Thioäthercarbonsäure.
Die Konjugation der Steroidcarbonsäure an das Trägerprotein erfolgt nach bewährten Methoden der Knüpfung von Peptidbindungen.
Über die Bildung eines "gemischten Anhydrids" (mixed anhydrid) wird die Carboxylgruppe aktiviert, welche anschließend mit ε-Aminogruppen von Lysinresten des Trägerproteins im Sinne der Säureamidbildung reagieren.

Mit dieser Methode lassen sich 19 Mol Steroidderivat pro Mol Proteinträger koppeln.

Der zweite Abschnitt beschreibt die Synthese eines Dehydroepiandrosteron-Proteinkonjugats.
Auch bei dieser Synthese wird die Position 7 des Steroidkörpers als Anker für die Verknüpfung gewählt. Im Gegensatz zur vorherigen Synthese soll eine sp^2-Hydridisierung des C7-Atoms eine gewisse Fixierung der Steroiddeterminante am Proteinträger bewirken.
Deshalb wird Kohlenstoffatom 7 mit Natriumchromat aufoxidiert.
Es ist jedoch erforderlich, zunächst die 17-Ketofunktion des Dehydroepiandrosteronsystems zu schützen. Dies erreicht man durch Reaktion mit Äthylenglykol zum 1,3-Dioxolan.
Nach Oxidation des C7-Atoms läßt sich die entstandene 7-Ketoverbindung unter Erhaltung der Ketalschutzgruppe am C17 in wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung ausfällen und physikalisch charakterisieren. Anschließend kondensiert man mit Carboxylmethoxylaminhemihydrochlorid zum Carboxymethyloxim. Nach Ketalspaltung und Saponifikation erhält man das 7-O-Carboxymethyloxin des Dehydroepiandrosterons.

Zur Darstellung des Proteinkonjugats wird diesmal das wasserlösliche Carbodiimid-Reagenz eingesetzt. Mit dieser Methode lassen sich jedoch nur 7 Mol Steroidderivat pro Mol Proteinträger kuppeln.

Die Molzahl der ans Protein gebundenen Steroidreste läßt sich im vorliegenden Fall relativ einfach durch UV-spektroskopische Messungen ermitteln.
Beim Androstendiol-Proteinkonjugat ist dies wegen unzureichender Chromophore nicht möglich. Man bedient sich dort einer enzymatischen Methode (Katalase-Methode) , welche selektiv das 3ß-Ol-5-en-System bei Steroiden detektiert.

Vergleicht man beide Kupplungsmethoden, so ist der "mixed anhydride"-Methode eine erheblich höhere Effektivität zuzubilligen.

Kapitel 4 beschäftigt sich eingehend mit der Dikussion der spektroskopischen Daten, wie IR, NMR, MS, UV und der Drehwerte, sowie deren tabellarischer Zusammenstellung.

Der immunologische Teil der Arbeit beschreibt die Immunisierung der Kaninchen mit den synthetisierten Steroid-Proteinkonjugaten, die Charakterisierung der erhaltenen Antiseren und die Entwicklung eines Radioimmunoassay zur Messung von Androstendiol.

Die Immunisierung von je 6 Kaninchen erfolgt über einen Zeitraum von 30 Wochen mit dreiwöchentlichen Booster-Injektionen.

Nach 20 Wochen zeigen 2 Kaninchen, welche mit dem Androstendiol-konjugat immunisiert werden, hohe Antikörpertiter. Diese Antiseren werden näher charakterisiert.

Die Antikörperproduktion der mit dem DHEA-Konjugat immunisierten Kaninchen war unbefriedigend, so daß eine Charakterisierung nicht sinnvoll erschien.

Nach der Scatchard-Analyse wird die Affinität der hochtitrigen Antiseren ermittelt.
Die Affinitätskonstanten beider Antiseren liegen im Bereich von 3×10^9 L/Mol, erfüllen somit die Kriterien für den Einsatz im Radioimmunoassay.

Die Spezifität der Antiseren wird durch Bestimmung der Kreuzreaktivität mit anderen, ähnlichen Steroiden festgelegt.
Beide untersuchten Antiseren sind in der Lage Variationen im Bereich der funktionellen Gruppen der Steroide, sowohl in 3-Stellung, als auch in 17-Stellung zu unterscheiden. Selbst sterische Änderungen der funktionellen Gruppen innerhalb des Androstendiolsystems werden hinreichend erkannt.

Beide Antiseren vermögen jedoch Veränderungen am ungesättigten System des Androstendiolmoleküls nur unzureichend zu differenzieren.
Man stellt bis zu 80% Kreuzreaktion der Antiseren mit 5α-Androstandiol fest.

Dieser Umstand bedeutet eine vorherige chromatographische Separierung des Androstandiols vor der eigentlichen radioimmunologischen Bestimmung des Androstendiols.

Über Bindungsstudien werden die optimalen Inkubationsbedingungen der Antiseren für den RIA festgelegt.
Bereits nach zweistündiger Inkubation erreicht man eine Gleichgewichtseinstellung der Antigene um vorhandene Bindungsstellen im Antiserum.
Bei einer Endverdünnung des Antiserums A110/7 von 1 : 3600 werden nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 4° C ca. 40% Nullbindung erreicht.

Die Abtrennung von ungebundener Aktivität erreicht man mittels Absorption an Dextran behandelter Aktivkohle.

Die Empfindlichkeit des RIA liegt unter diesen Reaktionsbedingungen bei 15 pg Androstendiol. Innnerhalb der Grenzen zwischen 20 pg und 1000 pg werden unbekannte Proben mit ausreichender Genauigkeit detektiert.
Der Variationskoeffizient bei Mehrfachbestimmungen liegt zwischen 7% und 14% .

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. S. A. Berson, R. S. Yalow, Advances Biol. Med. Phys. 6, 349 (1958)
2. R.S. Yalow, S.A. Berson, J. Clin. Invest. 39, 1996 (1959)
3. R.S. Yalow, S.A. Berson, J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)
4. R.P. Ekins, Clin. Chim. Acta 5, 453 (1960)
5. G.M. Grodsky, P.H. Forsham, J. Clin. Invest. 39, 1070 (1960)
6. R.P. Utinger, J. Clin. Invest. 41, 254 (1962)
7. G.C. Oliver, J. Lab. Clin. Med. 68, 1002 (1966)
8. L.A. Steiner, Proc. Nat. Acad. Science 168, 1347 (1969)
9. S. Spector, C.W. Parker, Science 168, 1347 (1970)
10. S. Liebermann, B.F. Erlanger, S.M. Beiser, F.J. Agate, Rec. Progr. Horm. Res. 15, 165 (1959)
11. G.E. Abraham, Acta Endocrin. Copenh. Suppl. 183, 1 (1974)
12. E. Kuss, R. Goebel, H. Enderle, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 354, 347 (1973)
13. H.R. Lindner, E. Perel, A. Friedlander, Research on Steroids, Pergamon Press Oxford, 4, 197 (1970)
14. G.D. Niswender, A.R. Midgley, Immnologic Methods in Steroid Determination, Meredith Corporation New York, S. 149 (1970)
15. F. Dray, M. Terqui, B. Desfosses, J.M. Chauffournier, J. Mowszowics, D. Kuhn, M.F. Jayle, C. R. Acad. Sc. Paris 273, 2380 (1971)
16. D. Exley, M.G. Johnson, P.D.G. Dean, Steroids 18.5, 605 (1971)
17. S.L. Jeffcoate, J.E. Searle, Steroids 19.2, 181 (1972)
18. H.R. Lindner, E. Perel, A. Friedlander, A. Zeitlin, J. Endocrin. 52.1, XVII (1972)

19. A. Weinstein, H.R. Lindner, A. Friedlander, S. Bauminger, Steroids 20.6, 789 (1972)

20. R.J. Dorfman, R.A. Shipley, Androgens, John Wileys and Sons New York, S. 116 (1956)

21. E.E. Baulieu, E. Wallace, S. Lieberman, J. Biol. Chem. 238, 1316 (1963)

22. E.E. Baulieu, P. Robel, Steroids 2, 111 (1963)

23. R. Forleo, W. Ingiulla, Steroids 10, 347 (1967)

24. R.L. Rosenfield, P. Otto, J. Clin.Endocrinol. Metab. 35, 818 (1972)

25. K. Demisch, W. Magnet, M. Neubauer, K. Schöffling, J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 129 (1973)

26. M.A. Kirschner, S. Sinhamapatra, J.R. Zucker, L. Loriaux, E. Nieschlag, J. Clin.Endocrinol. Metab. 37, 183 (1973)

27. J. Poortman, J.A.C. Prenen, F. Schwarz, J.H.W. Thijssen, J. Clin.Endocrinol.. Metab. 40, 373 (1975)

28. J.A. Bermudez, Y. Coronado, A. Mijaves, C. Leon, A. Velasquez, R. Norle, J.L. Mateos, J. Ster. Biochem. 6, 283 (1975)

29. K. Ziegler, A. Späth, E. Schaaf, W. Schumann, E. Winkelmann, Ann. der Chemie 551, 80 (1942)

30. J.A. Keverling-Buisman, W. Stevens, J.v.d.Vliet, Rec. trav. chim. 66, 83 (1947)

31. A. Friedlander, E. Perel, A. Zeitlin, H.R. Lindner, Steroids 19, 327 (1972)

32. D.K. Fukushima, S. Lieberman, B. Praetz, J. Am. Chem. Soc. 72, 5205 (1950)

33. M. Zwirner, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1975)

34. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Liebermann, J. Biol. Chem. 234, 1090 (1959)

35. P.N. Rao, P.H. Moore, Steroids 24, 793 (1974)

36. M. Numazawa, Y. Osawa, Steroids 34, 347 (1979)

37. R. Condom, B. Desfosses, J.Ster. Biochem. 8, 1263 (1977)

38. E.G. Howard, R.V. Lindsay, J. Am. Chem. Soc. 82, 158 (1960)

39. J.E. Shields, W.H. McGregor, F.H. Carpenter, J.Org. Chem. 26, 1491 (1961)

40. J.L. Mateos, J. Org. Chem. 24, 2034 (1959)

41. H.H. Westen, Helv. Chimia Acta 47, 575 (1964)

42. R.C. Esse, J.A. Lowery, C.R. Tamorria, G.M. Sieger, J. Am. Chem. Soc. 86, 3874 (1964)

43. G. Bianchi, P. Grünanger, A. Perotti, Tetrahedron Lett. 1974, S. 157

44. R. Antonucci, S. Bernstein, D. Giancola, K.J. Sax, J. Org. Chem. 16, 126 (1951)

45. C. Djerassi, G. von Mutzenbacher, J. Fajkos, D.H. Williams, H. Budzikiewicz, J. Am. Chem. Soc. 87, 817 (1965)

46. B. Duval, B. Desfosses, R.Emiliozzi, Steroids 35, 235 (1979)

47. H.R. Lindner, E. Perel, S.M. Beiser, A. Friedlander, A. Zeitlin, Steroids 19, 357 (1972)

48. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Liebermann, J. Biol. Chem. 228, 713 (1957)

49. E. Brand, Ann. N.Y. Acad. Sc. 47, 187 (1946)

50. F. Kohen, S. Bauminger, H.R. Lindner, Steroids 20, 278 (1973)

51. F. Sanger, J. Biochem. 39, 507 (1949)

52. S. Moore, W.H.J. Stein, J. Biol. Chem. 211, 907 (1954)

53. E. Borek, H.T. Clarke, J. Am. Chem. Soc. 58, 2020 (1936)

54. C.W. Marshall, R.E.Ray, I. Laos, B. Riegel, J. Am. Chem. Soc. 79, 6308 (1957)

55. B.F. Erlanger, F.Borek, S.M. Beiser, S. Liebermann, J. Biol. Chem. 234, 1090 (1959)

56. S. Bauminger, H.R. Lindner, F. Perel, R.J. Arnon, J. Endocrin. 44, 567 (1969)

57. U. Westphal, Arch. Biochem. and Biophys. 66, 71 (1957)

58. C. Stora, R. Freymann, Compt. Rend. 209, 752 (1939)

59. K. Dobriner, E.R. Katzenellenbogen, R.N. Jones, Infrared Absorption Spectra of Steroids, Interscience New York (1952)

60. G. Roberts, B.S. Gallagher, R.N. Jones, Infrared Spectra of Steroids Vol. II, Interscience New York (1958)

61. W. Neudert, H Röpke, Steroid-Spektrenatlas, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1965

62. L.P. Kuhn, J. Am. Chem. Soc. 74, 2492 (1952)

63. A.R.H. Cole, G.T.A. Muller, D.W. Thornton, R.L.S. Willix, J. Chem. Soc. (London), 1959, S. 1218

64. H.H. Zeiss, M. Tsutsui, J. Am. Chem. Soc. 75, 897 (1953)

65. D.R. Johnson, D.R. Idler, V.W. Meloche, C.A. Baumann, J. Am. Chem. Soc. 75, 52 (1953)

66. R.N. Jones, P. Humphries, E. Packard, K. Dobriner, J. Am. Chem. Soc. 72, 86 (1950)

67. J. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc. 74, 5337 (1952)

68. J.F. Templeton, C.W. Wie, Tetrahedron Lett. 1961, S. 3955

69. R.N. Jones, A.H.R. Cole, J. Am. Chem. Soc. 74, 5648 (1952)

70. M. Kraft, Mh. Chem. 103, 1194 (1972)

71. R.N. Jones, K. Dobriner, Vitamins and Hormones 7, 293 (1949)

72. S.S. Friedland, G.H. Lane, R.T. Longman, K.E. Train, M.J. O'Neil, Anal. Chem. 31, 169 (1959)

73. S. Bergström, R. Ryhage, E.Stenhagen, Svebsk Kem. Tids 73, 566 (1961)

74. B.E. Gustafsson, J.A. Gustafsson, J, Sjövall, Acta Chem. Scand. 20, 1827 (1966)

75. G. Galli, S. Maroni, Steroids 10, 189 (1967)

76. H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D.H. Williams, Mass Spectrometry of Organic Compounds, Holden Day San Francisco, (1967)

77. L. Tökes, G. Jones, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc. 90, 5465 (1968)

78. G. Spiteller, M. Spiteller-Friedmann, Ann. Chem. 693, 1 (1966)

79. S. Sternhell, J. Chem. Soc. C (1968) S. 792

80. N.S. Bhacca, D.H. Williams, Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, Holden Day Inc. San Francisco, (1964)

81. N.S. Bhacca, A.J. Meyers, Tetrahedron Lett. (1968), S. 2293

82. A.J. Cohen, S. Rock, Steroids 3, 243 (1964)

83. K. Tori, E. Kondo, Steroids 4, 713 (1964)

84. D. Duval, B. Desfosses, R. Emiliozzi, Steroids 36, 287 (1980)

85. A. Marquet, M. Dvoliatzky, H.B. Kagan, L. Mamlol, C. Quannes, J. Quannes, J. Bull. Soc. Chim. France, 1822, (1961)

86. M. Numazawa, Y. Osawa, Steroids 34, 347 (1979)

87. C. Djerassi, G. von Mutzenbacher D.H. Williams, H. Budzikiewicz, J. Am. Chem. Soc. 67, 817 (1965)

88. M. Karplus, J. Am. Chem. Soc. 85, 2870 (1963)

89. R. Condom, R. Emiliozzi, Steroids 23, 483 (1975)

90. L. Milewich, C. Gomez-Sanchez, P.C. MacDonald, P.K. Siiteri, J. Ster. Biochem. 6, 1381 (1975)

91. D. Handschuh, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

92. J.W. Blunt, J.B. Stothers, Org. Magn. Res. 9, 439 (1977)

93. G.W. Buchanan, D.A. Ross, J.B. Stothers, J. Am. Chem. Soc. 88, 4301 (1966)

94. D.M. Grant, E.G.Paul, J. Am. Chem. Soc. 86, 2984 (1964)

95. H.L. Holland, E.M. Thomas, J. Canad. Chem. 57, 3069 (1979)

96. E. Breitmeier, G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977, S. 309

97. E. Breitmeier, G. Haas, W. Voelter, Atlas of Carbon-13 NMR Data, Heyden, London,Philadelphia, Rheine (1979)

98. L. Fieser, M. Fieser, Steroide, Verlag Chemie Weinheim, (1969) S. 18

99. B. Hampel, Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, Friedrich Vieweg und Sohn Braunschweig (1962)

100. E.A. Braude, Determination of Organic Structures by Physical Methods, Academic Press New York, (1955) S. 131

101. A.E. Gillam, E.S.Stern, An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry, Arnold Ltd. London (1954)

102. P. Striebel, Ch. Tamm, Helv. Chim. Acta (1954), 1094

103. G. Uhlenbrunck, Immunbiologie, Gollmann München (1971)

104. J.H. Humphrey, R.G. White, Lehrbuch der Immunbiologie, Thieme Stuttgart (1972)

105. S. Sell, Immunbiologie, Immunpathologie und Immunität, Verlag Chemie Weinheim (1977)

106. L. Goodfriend, A. Schon, Immunologic Methods in Steroid Determination, Appleton-Century-Crafts New York (1970) S. 15

107. R. Henning, J. McCracken, M. St. Cyr, R. Underwood, G. Williams, G.E. Abraham, Steroids 20, 73 (1972)

108. G.E. Abraham, Acta Endocrin. Copenh. Suppl. 183, 1 (1974)

109. J. Vaitukaitis, J.B. Robbins, E. Nieschlag, G.T. Ross, J. Clin.Endocrinol. Metab. 33, 988 (1971)

110. M. Zwirner, M.M. Fawzy, F.C. Bopp, E. Klemm-Wolfgram, D. Handschuh, W. Voelter, A.E. Schindler, Arch, Gynecol. 233, 229 (1983)

111. H. Feldmann, D. Rodbard, Principles of Competitive Protein-Binding Assays, J.B. Lippincolt Philadelphia (1971) S. 158

112. G.E. Abraham, W.D.Odell, Radioimmunoassay of Steroids, Appleton-Century-Crafts New York (1970) S. 87

113. R.E. Buller, W.T. Schrader, B.W. O'Malley, J. Ster. Biochem. 7, 321 (1976)

114. J.M. Boeynaems, J. Dumont, Outlines of Receptor Theory, Elsevier North Holland Biomedical Press (1980)

115. G.E. Abraham, J. Clin.Endocrinol. Metab. 29, 866 (1969)

116. S. de Lauzon, N. Cittanova, B. Desfosses, M.F. Jayle, Steroids 22, 747 (1973)

117. F.Z. Stanczyk, U. Goebelsmann, J. Ster. Biochem. 14, 53 (1980)

118. B.Pelc, A.C. Holmes, J. Ster. Biochem. 16, 731 (1982)

119. G.E. Abraham, Acta Endocrin. (Suppl. 183 Copenh.) 75, 1 (1974)

120. G.E. Abraham, La Ricerca Clin. Lab. 4, 999 (1974)

121. D. Rodbard, Clin. Chim. 20, 1255 (1974)

122. J.C. Sheehan, G.P.Hess, J. Am. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)

123. A.Friedlander, S. Weinstein, H.R. Lindner, S. Bauminger, Steroids 20, 789 (1972)

124. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden II, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974) S.296

125. P.N. Rao, A.H. Khan, P.H. Moore, J.W. Goldzieher, Steroids 24, 793 (1974)

126. P. Röschlau, E. Bernt, N. Gruber, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 403 (1974)

127. C. Michalec, Biochem. et Biophys. Acta 19, 187 (1956)

128. R. Tschesche, J. Chromatogr. 5, 217 (1961)

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

E. Bayer, W. Braun, M. Hanack, G. Häfelinger, W. Krauß,
U. Kunze, G. Kortüm, E. Lindner, E. Mauser, E. Müller,
H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz, S. Kemmler-Sack,
A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, F.F. Seelig, H. Stegmann,
H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil (im Bereich Chemie)

H. Auterhoff, H. Ammon, E. Graf, H. Hamacher, K.A. Kovar,
F. Moll, E. Reinhard (im Bereich Pharmazie)

S. Baumann, H. Krüger (im Bereich Physik)

LEBENSLAUF

Am 28. Dezember 1947 wurde ich als Sohn des Forstfacharbeiters Willy Zwirner und dessen Ehefrau Lydia, geb. Herrmann, in Stuttgart geboren.

Von 1954 bis 1959 besuchte ich die Grund- und Hauptschule in Hildrizhausen. Im Herbst 1959 trat ich in das Schickhardt-Gymnasium Herrenberg ein. Dort legte ich im April 1968 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Die Diplomvorprüfung in Chemie bestand ich im September 1971, die Hauptdiplomprüfung im März 1974.

Von April 1974 bis Oktober 1975 schloß sich der experimentelle Teil der Diplomarbeit mit dem Thema "Komplexbildung acetylensubstituierter Diarylcarbinole mit Übergangsmetallen" unter der Leitung von Professor Dr. E. Müller im Institut für Organische Chemie an.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf, welches ich im Herbst 1978 mit dem 2. Staatsexamen abschloß.

Im November 1975 begann ich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation im chemischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Damit verbunden war eine Anstellung als technischer Angestellter im endokrinologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik.

Im Oktober 1978 wurde ich als wissenschaftlicher Angestellter in den Bereich der Universitäts-Frauenklinik übernommen, und übe seither die Stelle des Laborleiters aus.

Seit September 1977 bin ich mit Luitgard Zwirner, geb. Oelmaier verheiratet; wir haben zwei Söhne.